



Instituto de  
Recursos Naturales  
y Agrobiología  
de Sevilla



# ***VIDA MICROBIANA A TEMPERATURAS ELEVADAS. DIVERSIDAD, AISLAMIENTO, TERMOESTABILIDAD MOLECULAR Y GENÓMICA***

Memoria que presenta

María de Piedras Alba Cuecas Morano  
para optar al título de Doctor en Biología  
Molecular y Biomedicina

En Sevilla, a ..... de ..... de 2017

# **VIDA MICROBIANA A TEMPERATURAS ELEVADAS. DIVERSIDAD, AISLAMIENTO, TERMOESTABILIDAD MOLECULAR Y GENÓMICA**

Visado en Sevilla, a ..... de ..... de 2017

## **LOS DIRECTORES**

Dr. D. Juan Miguel González Grau  
Investigador científico del CSIC  
IRNAS-CSIC

Dra. D<sup>a</sup>. María Del Carmen Portillo Guisado  
Investigadora Postdoctoral contratada  
Universidad Rovira i Virgili

## **EL TUTOR**

Dr. D. ANTONIO VENTOSA UCERO  
Catedrático de la Universidad de Sevilla  
Facultad de Farmacia

Memoria que presenta

María de Piedras Alba Cuecas Morano  
para optar al título de Doctor en Biología  
Molecular y Biomedicina

DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "VIDA MICROBIANA A TEMPERATURAS ELEVADAS. DIVERSIDAD, AISLAMIENTO, TERMOESTABILIDAD MOLECULAR Y GENÓMICA", presentada por D<sup>a</sup>. María de Piedras Alba Cuecas Morano para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biomedicina, ha sido realizada en el Departamento de Biogeoquímica, Ecología Vegetal y Microbiana, bajo la dirección de los Drs. D. Juan Miguel González Grau y D<sup>a</sup>. María Del Carmen Portillo Guisado, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a ..... de ..... de 2017





## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan Miguel González Grau y a la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Portillo Guisado por su dirección, confianza y paciencia en el desarrollo de todos los trabajos, así como su dedicación absoluta en mi aprendizaje.

Agradezco la colaboración de los Drs.: W. Kanoksilapatham (Silpakorn University, Tailandia); X. Peng (Dalian University of Technology, China); J. Sánchez Perona (Instituto de la Grasa, Sevilla); J. F. Galisteo-López y H. Míguez (Instituto de Ciencias de Materiales de Sevilla).

A mis compañeros de grupo por el buen ambiente, respeto y apoyo y a las compañeras/os del IRNAS por su disposición para acogerme a pesar del poco tiempo que he podido compartir con ellos. Siempre se agradecen esas charlas en la primera rotonda de la primera planta.

A mi gran familia por su apoyo, confianza y comprensión de mis ausencias, a pesar su lejanía con el mundo científico. A ti por despertar mi curiosidad y tu constante confianza que siempre siento y a ti por tu fuerza y empuje. A mis hermanas por hacer que siempre me sienta acompañada.

A los muchos amigos y amigas que a pesar del tiempo y la distancia siempre están ahí para apoyarme y sacarme una sonrisa.

A la educación pública y a las distintas experiencias que han contribuido en mi formación.

A todas las personas que compartimos el placer de aprender.

A Miguel... por nuestro feliz día a día.

Se agradece la financiación recibida de:

Vida microbiana más allá de las condiciones óptimas. CGL2014-58762-P. MINECO, Plan Nacional I+D+i, Proyectos de Excelencia. Enero 2015-Diciembre 2017

Genómica comparada microbiana. CGL2015-71523-REDC. MINECO, Plan Nacioal I+D+i, Redes Consolider. Diciembre 2015 – Noviembre 2017.

Genómica comparada microbiana. Consolider CSD2009-00006. MINECO. Plan Nacional I+D+i, Proyecto Consolider. Diciembre 2009 – Junio 2015.

Diversidad microbiana y Microbiología de ambientes extremos. BIO 288. Junta de Andalucía.



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	V
ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS .....	XV
RESUMEN .....	XVII

<b>Capítulo 1:</b> Introducción .....	1
---------------------------------------	---

1.1. Diversidad microbiana .....	4
1.2. Comunidades microbianas.....	7
1.2.1. Análisis de las comunidades microbianas .....	9
1.3. Termófilos .....	12
1.4. Fuentes termales.....	14
1.5. Comunidades microbianas termófilas .....	18
1.6. Aislamiento y caracterización de bacterias.....	21
1.7. Genómica.....	29
1.8. Transferencia horizontal de genes.....	30
1.8.1. Transposasas.....	33
1.9. Termoestabilidad molecular .....	36
1.9.1. Macromoléculas .....	36
1.9.2. Biomoléculas de bajo peso molecular.....	38
1.10. Citoplasma y viscosidad celular.....	39
1.11. Objetivos.....	43
1. 12. Bibliografía.....	44

<b>Capítulo 2:</b> Comunidades bacterianas en aguas termales. Estudio a lo largo de un gradiente de temperatura de 50°C .....	69
---	----

2.1. Resumen .....	70
2.2. Introducción.....	71
2.3. Materiales y Métodos .....	73
2.3.1. Puntos de muestreo. ....	73
2.3.2. Caracterización de las comunidades microbianas.....	77
2.3.3. Identificación de bacterias y diferenciación de sus comunidades .....	80
2.3.4. Análisis filogenéticos .....	82
2.4. Resultados.....	82
2.5. Discusión .....	93
2.6. Conclusiones.....	98
2.7. Bibliografía.....	100

**Capítulo 3:** *Fervidobacterium thailandense* sp. nov., un nuevo termófilo extremo aislado de una fuente termal al norte de Tailandia ..... 107

3.1. Resumen .....	108
3.2. Introducción.....	109
3.3. Materiales y métodos .....	110
3.4. Resultados y discusión .....	114
3.5. Descripción de <i>Fervidobacterium thailandense</i> sp. nov. ....	126
3.6. Bibliografía.....	128

**Capítulo 4:** Análisis de transferencia horizontal en el género *Fervidobacterium* mediante análisis comparativo de los genes que codifican transposasas ..... 131

4.1. Resumen .....	132
--------------------	-----

4.2. Introducción.....	133
4.3. Materiales y Métodos .....	135
4.3.1. Genomas, genes y análisis filogenéticos .....	135
4.3.2. Análisis multivariable de frecuencias de Tetranucleotidos .....	136
4.3.3. Análisis de secuencias repetitivas .....	136
4.3.4. Estimaciones de divergencia K-L .....	137
4.4. Resultados.....	137
4.4.1. Clasificación de las transposasas en genomas de <i>Fervidobacterium</i> .....	137
4.4.2. Transposasas IS605_I .....	139
4.4.3. Transposasas ISL3 .....	146
4.4.4. Transposasas Tipo C .....	152
4.4.5. Transposasas Tipo D .....	158
4.5. Discusión .....	165
4.6. Conclusiones .....	168
4.7. Bibliografía.....	169
4.8. Anexos.....	172

## **Capítulo 5:** Viscosidad celular en procariotas y termoestabilidad de biomoléculas de bajo peso molecular ..... 245

5.1. Resumen .....	246
5.2. Introducción.....	247
5.3. Materiales y Métodos .....	250
5.3.1. Efecto de la viscosidad sobre la estabilidad del NADH.....	251
5.3.2. Efecto directo de la viscosidad sobre la degradación del NADH ... .....	252
5.3.3. Determinación de la viscosidad intracelular.....	252
5.4. Resultados.....	254

5.4.1. Efectos de la temperatura y la viscosidad en la degradación del NADH.....	254
5.4.2. Estabilización del NADH mediante el aumento de la viscosidad .....	257
5.4.3. Viscosidad celular.....	259
5.5. Discusión.....	264
5.6. Conclusiones.....	267
5.7. Bibliografía.....	269
 <b>Capítulo 6:</b> Discusión y conclusiones generales.....	 273
6.1. Discusión.....	274
6.2. Conclusiones.....	281
6.3. Trabajos publicados incluidos en este estudio .....	282
6.4. Bibliografía.....	283

## **ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

### **Lista de Tablas:**

<b>Tabla 1.1.</b>	26
<b>Tabla 2.1.</b>	76
<b>Tabla 3.1.</b>	118
<b>Tabla 3.2.</b>	122
<b>Tabla 3.3.</b>	124
<b>Tabla 3.4.</b>	125
<b>Tabla 4.1.</b>	138
<b>Tabla 4.2.</b>	142-143
<b>Tabla 4.3.</b>	149-151
<b>Tabla 4.4.</b>	155-156
<b>Tabla 4.5.</b>	161-163

### **Lista de Figuras:**

<b>Figura 1.1.</b>	3
<b>Figura 1.2.</b>	6
<b>Figura 1.3.</b>	8
<b>Figura 1.4.</b>	11
<b>Figura 1.5.</b>	15
<b>Figura 1.6.</b>	16
<b>Figura 1.7.</b>	31
<b>Figura 1.8.</b>	34
<b>Figura 1.9.</b>	40
<b>Figura 1.10.</b>	41
<b>Figura 2.1.</b>	74
<b>Figura 2.2.</b>	75
<b>Figura 2.3.</b>	83
<b>Figura 2.4.</b>	84
<b>Figura 2.5.</b>	86
<b>Figura 2.6.</b>	87
<b>Figura 2.7.</b>	89
<b>Figura 2.8.</b>	91
<b>Figura 2.9.</b>	92
<b>Figura 2.10.</b>	94

<b>Figura 3.1.</b>	115
<b>Figura 3.2.</b>	116
<b>Figura 3.3.</b>	117
<b>Figura 3.4.</b>	120
<b>Figura 3.5.</b>	121
<b>Figura 3.6.</b>	123
<b>Figura 4.1.</b>	140
<b>Figura 4.2.</b>	141
<b>Figura 4.3.</b>	144
<b>Figura 4.4.</b>	147
<b>Figura 4.5.</b>	148
<b>Figura 4.6.</b>	149
<b>Figura 4.7.</b>	153
<b>Figura 4.8.</b>	154
<b>Figura 4.9.</b>	157
<b>Figura 4.10.</b>	159
<b>Figura 4.11.</b>	160
<b>Figura 4.12.</b>	161
<b>Figura 5.1.</b>	255
<b>Figura 5.2.</b>	256
<b>Figura 5.3.</b>	258
<b>Figura 5.4.</b>	260
<b>Figura 5.5.</b>	261
<b>Figura 5.5.</b>	263

#### **Anexos (Capítulo 4):**

##### **Tablas:**

<b>Tabla 4.6.</b>	174, 177-180
<b>Tabla 4.7.</b>	184-185
<b>Tabla 4.8.</b>	189-190
<b>Tabla 4.9.</b>	194-195
<b>Tabla 4.10.</b>	199
<b>Tabla 4.11.</b>	203
<b>Tabla 4.12.</b>	207-208
<b>Tabla 4.13.</b>	211-212
<b>Tabla 4.14.</b>	215-216



<b>Tabla 4.15.</b>	220
<b>Tabla 4.16.</b>	224-225
<b>Tabla 4.17.</b>	229-230
<b>Tabla 4.18.</b>	234
<b>Tabla 4.19.</b>	238-239
<b>Tabla 4.20.</b>	243-244

## **Figuras:**

<b>Figura 4.13.</b>	173
<b>Figura 4.14.</b>	174-175
<b>Figura 4.15.</b>	174, 176
<b>Figura 4.16.</b>	181
<b>Figura 4.17.</b>	182
<b>Figura 4.18.</b>	183
<b>Figura 4.19.</b>	186
<b>Figura 4.20.</b>	187
<b>Figura 4.21.</b>	188
<b>Figura 4.22.</b>	191
<b>Figura 4.23.</b>	192
<b>Figura 4.24.</b>	193
<b>Figura 4.25.</b>	196
<b>Figura 4.26.</b>	197
<b>Figura 4.27.</b>	198
<b>Figura 4.28.</b>	200
<b>Figura 4.29.</b>	201
<b>Figura 4.30.</b>	202
<b>Figura 4.31.</b>	204
<b>Figura 4.32.</b>	205
<b>Figura 4.33.</b>	206
<b>Figura 4.34.</b>	209
<b>Figura 4.35.</b>	210
<b>Figura 4.36.</b>	211
<b>Figura 4.37.</b>	213
<b>Figura 4.38.</b>	214
<b>Figura 4.39.</b>	215
<b>Figura 4.40.</b>	217
<b>Figura 4.41.</b>	218

<b>Figura 4.42.</b>	219
<b>Figura 4.43.</b>	221
<b>Figura 4.44.</b>	222-223
<b>Figura 4.45.</b>	224
<b>Figura 4.46.</b>	226
<b>Figura 4.47.</b>	227
<b>Figura 4.48.</b>	228
<b>Figura 4.49.</b>	231
<b>Figura 4.50.</b>	232
<b>Figura 4.51.</b>	233
<b>Figura 4.52.</b>	235
<b>Figura 4.53.</b>	236
<b>Figura 4.54.</b>	237
<b>Figura 4.55.</b>	240
<b>Figura 4.56.</b>	241
<b>Figura 4.57.</b>	242

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANI	Average Nucleotide Identity
ANOVA	Analysis of variance; análisis de la varianza
APS	Ammonium persulfate; peroxodisulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine triphosphate; adenosín trifosfato
bp	base pairs; pares de bases
CDS	Coding sequences; secuencias codificantes
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMC	Carboximetilcelulosa
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid; ácido etilendiaminotetraacético
FAMEs	Fatty Acid Methyl Esters; ésteres metílicos de ácidos grasos
FMN	Flavin mononucleótido
HCl-Tris	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
HGT	Horizontal Gene Transfer; transferencia horizontal de genes
ID	Identificación
IR	Inverted Repeat; secuencias repetitiva invertida
IRF	Instrument Response Function; función de respuesta instrumental
IS	Insertion Sequence; secuencia de inserción
JCM	Japan Collection of Microorganisms
Divergencia K-L	Índice de divergencia Kullback-Leiber
LSD	Least Significant Difference
MGE	Mobile Genetic Elements; elementos genéticos móviles
MIS	Microbial Identification System
MIDI	Microbial IDentification Inc.
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidized form); nicotin adenin dinucleótido (forma oxidada).
NAD(P)H	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) (reduced form); nicotin adenin dinucleótido (forma reducida).

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMDS	Non-metric MultiDimensional Scaling
TEMED	TEtrametiletilendiamina
ORF	Open Reading Frame; marco abierto de lectura
OTUs	Operational Taxonomic Unit; unidad taxonómica operacional
PCR	Polymerase Chain Reaction
p/v	Peso/Volumen
SEM	Scanning Electron Microscopy; microscopía electrónica de barrido
UV	Ultravioleta

## **RESUMEN**

A pesar de los numerosos estudios publicados sobre la vida a altas temperaturas, aún existen aspectos fundamentales por comprender. La presente tesis estudia la vida microbiana a altas temperaturas desde diferentes enfoques. Por un lado, analizamos la influencia de la temperatura sobre la distribución de los microorganismos tomando como modelo un gradiente de temperatura natural de 50°C en una fuente termal. La temperatura y las interacciones entre sus componentes resultaron ser determinantes para estructurar las comunidades microbianas. El aislamiento de una nueva especie de bacteria termófila extrema y anaeróbica, *Fervidobacterium thailandense* FC2004T, y la secuenciación de su genoma hace posible un estudio en detalle y su clasificación taxonómica. La comparación de cuatro genomas dentro del género *Fervidobacterium* ha permitido determinar que los genes que codifican transposasas son un modelo adecuado para analizar fenómenos de intercambio de material genético (transferencia horizontal de genes, HGT) y evaluar la plasticidad de estos genomas y su historia evolutiva. Los microorganismos termófilos viven a temperaturas a las que numerosas biomoléculas, como el NADH, son inestables. La viscosidad influye decisivamente en la estabilización de esas pequeñas biomoléculas. La viscosidad intracelular en microorganismos termófilos (entre 50 y 80°C) era relativamente elevada, lo que confirma el efecto estabilizador de la viscosidad. Esta tesis contribuye a comprender la importancia de la temperatura sobre los microorganismos y sus comunidades microbianas, su capacidad para desarrollarse a temperaturas elevadas, así como el dinamismo de sus genomas y fenotipos.



## *Capítulo 1*

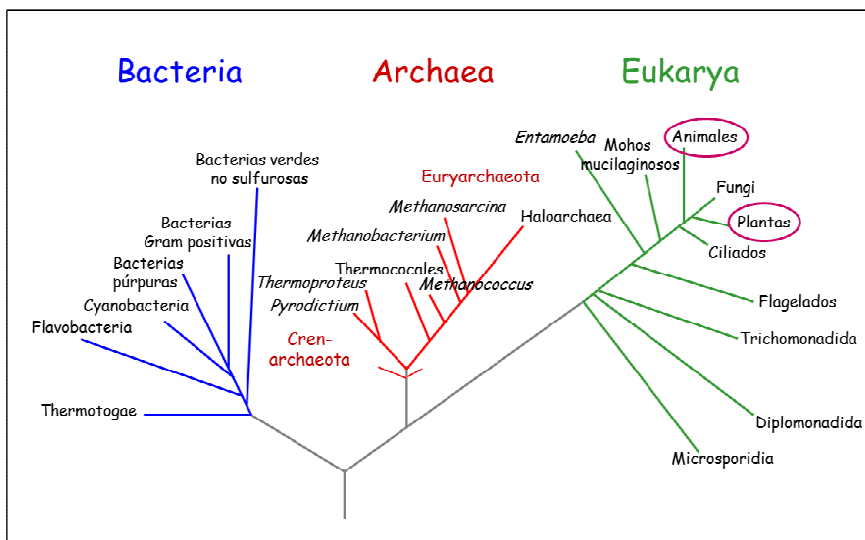
# **Introducción**

Los microorganismos destacan por su gran diversidad y abundancia. Se considera que los microorganismos constituyen el grupo de organismos más diverso en nuestro planeta (Curtis et al., 2002). Esta gran diversidad de microorganismos se refleja en el árbol filogenético universal (Figura 1.1) (Woese et al., 1990), ya que sólo dos de las ramas finales del dominio *Eukarya* corresponden con organismos superiores (animales y plantas), mientras que el resto de organismos corresponden con formas de vida microbiana, principalmente representados en los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Se considera que sólo se conoce un porcentaje mínimo del total de las especies microbianas existentes (Rappé y Giovannoni, 2003).

Otra característica de los microorganismos es su gran versatilidad metabólica. Este rasgo explica, entre otros, el papel esencial que juegan en los ciclos biogeoquímicos de los elementos (Whitman et al., 1998). Existen transformaciones biogeoquímicas que son llevadas a cabo exclusivamente por microorganismos, como por ejemplo, la metanogénesis (producción de metano), la desnitrificación (transformación de nitrato a nitrógeno) o la reducción de sulfato (reducción de sulfato generando sulfhídrico), entre otras.

Debido a su versatilidad, los microorganismos son capaces de desarrollarse en gran variedad de hábitats y de adaptarse a distintas condiciones (Cases y de Lorenzo, 2002). Por ejemplo, existen microorganismos que viven en condiciones que se consideran extremas desde el punto de vista antropocéntrico (Vorgias y Antranikian., 2004), a estos microorganismos se les conoce con el nombre de extremófilos. Entre los microorganismos extremófilos están los psicrófilos (si viven a baja temperatura), termófilos (viven a altas temperaturas), halófilos (alta concentración de sales), acidófilos (pH ácido), alcalófilos (pH alcalino), barófilos (elevada presión) o xerófilos (resistentes a desecación), entre otros. Los microorganismos extremófilos emplean diversas estrategias para vivir en esas condiciones extremas. El estudio de esos mecanismos adaptativos es de





**Figura 1.1.** Árbol filogenético simplificado de los organismos vivos basado en secuencias de las subunidades pequeñas de genes de ARNr (16S para procariotas y 18S para eucariotas) (modificado del modelo propuesto por Woese, 1990).

gran interés biológico, tanto desde el punto de vista evolutivo y fisiológico como biotecnológico.

## **1.1 Diversidad microbiana**

La diversidad microbiana se refiere a la variedad de microorganismos existentes. Conocer la diversidad microbiana es importante para entender el papel de los microorganismos en el funcionamiento de los ecosistemas y evaluar su aplicabilidad biotecnológica.

Históricamente, la forma de determinar los microorganismos presentes en una muestra se basaba en su cultivo. Según los conocimientos actuales, esta metodología resulta insuficiente para el estudio de los microorganismos en sistemas naturales ya que sabemos que sólo un máximo del 1% de los microorganismos suelen poder ser cultivados (Hugenholtz et al., 1998; González y Saiz-Jiménez, 2004). Atendiendo únicamente a los cultivados, la visión que obtendríamos sobre los microorganismos presentes en una muestra concreta resultaría muy limitada.

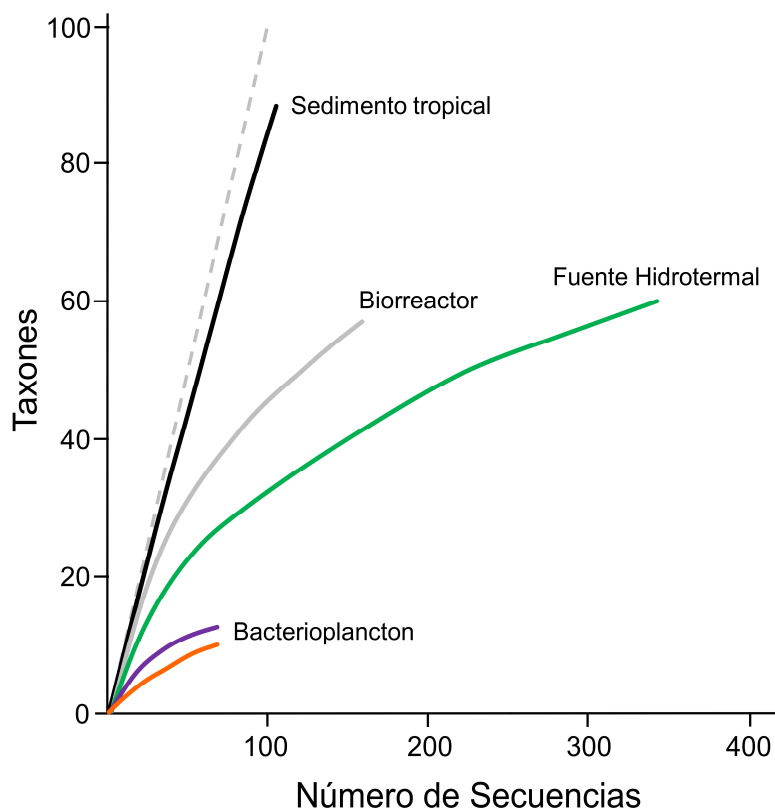
Más recientemente, el desarrollo de técnicas de Biología Molecular ha supuesto un gran avance. Su uso puso de manifiesto una elevada diversidad microbiana en la naturaleza (Amann et al., 1995; Pace, 1997; Muyzer y Smalla, 1998) y permitió el conocimiento de grupos microbianos desconocidos hasta la fecha (Kemp y Aller, 2004). En particular, las secuencias de los genes que codifican ARN ribosómico, especialmente el 16S (en procariotas) y 18S (en eucariotas) (ARNr 16S y 18S, respectivamente), han sido utilizados para inferir relaciones filogenéticas entre microorganismos (Woese, 1987; Yilmaz et al., 2014). Otros genes o, por ejemplo la región intergénica entre genes ARNr, también son

utilizados frecuentemente para la diferenciación de microorganismos (Kurtzman, 1992).

A pesar del avance que ha supuesto la utilización de las técnicas de Biología Molecular aún se desconoce el nivel real de la diversidad microbiana existente en nuestro planeta (Curtis et al., 2002; Pedrós-Alió, 2006). Ello es debido a diversos factores, pero la limitación principal es metodológica y consecuencia de la gran diversidad microbiana existente. Los análisis de microorganismos en ambientes naturales se suelen basar en la amplificación de sus genes ARNr por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) aunque se sabe que esta técnica introduce sesgos de distinto tipo, como la generación de quimeras (Ashelford, et al., 2005; González et al., 2005), variaciones en la abundancia relativa de los microorganismos (González et al., 2012), problemas de amplificación y especificidad (Arezi et al., 2003; Hongoh et al., 2003; Wu et al., 2010), etc.

Una herramienta muy utilizada para evaluar la diversidad microbiana detectada en un ecosistema son las curvas de cobertura (Figura 1.2). Estas figuras son una representación del número de microorganismos distintos detectados en función del número de secuencias analizadas. Comparando distintas curvas de cobertura podemos determinar *a grosso modo* una mayor o menor diversidad relativa entre comunidades microbianas.

Para cuantificar la diversidad de las comunidades se utilizan diferentes parámetros o índices. Uno de los más usados es el índice de Shannon (Hill et al., 2003) que proporciona información acerca de la diversidad de una comunidad en un lugar determinado. También se han desarrollado índices para evaluar comparativamente la diversidad de distintas comunidades, como por ejemplo, aquellas separadas en el espacio, a lo largo del tiempo o por la influencia de un parámetro biótico o abiótico concreto. En estos casos el índice Bray-Curtis (Woodward et al., 2010) es uno de los más utilizados en Ecología Microbiana.



**Figura 1.2.** Ejemplos de curvas de cobertura para diversos ambientes. La pendiente 1:1 está representada como referencia (modificada de Kemp y Aller, 2004).

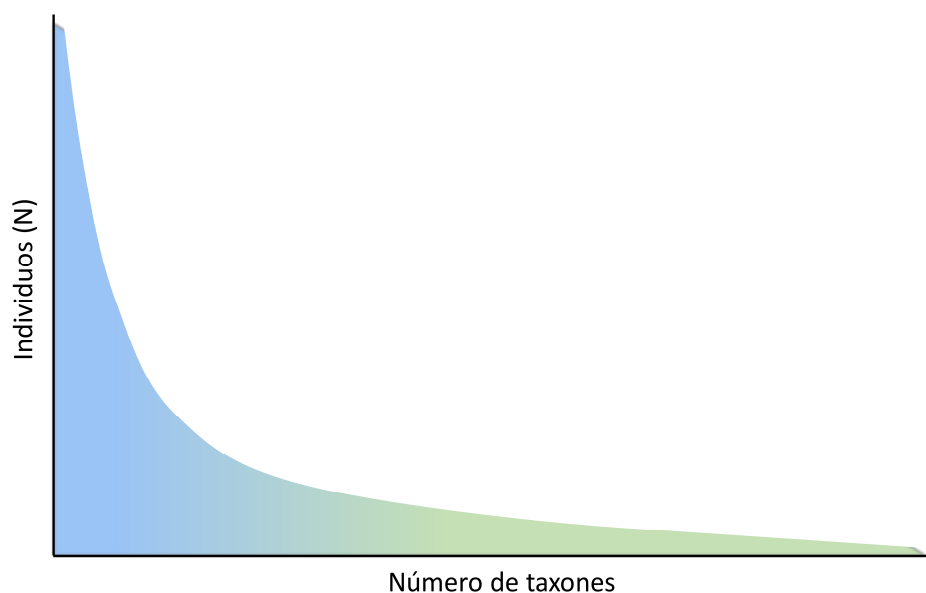
## **1.2. Comunidades microbianas**

Entendemos como comunidad microbiana al conjunto de microorganismos presentes en un hábitat determinado. El estudio de la estructura de las comunidades microbianas consiste en conocer tanto la diversidad de los microorganismos que la componen como la proporción en la que se encuentra cada uno de esos microorganismos. Ello constituye un primer paso para determinar el papel de las comunidades microbianas y sus componentes en un ecosistema (Prosser et al., 2007).

La visión actual existente sobre las comunidades microbianas considera que están constituidas por unos pocos microorganismos muy abundantes y muchos muy poco abundantes (Figura 1.3) (Curtis et al., 2002; Pedrós-Alió, 2006). Las distintas técnicas existentes nos proporcionarán acceso a la identificación de los miembros de las comunidades pero cada una de esas metodologías presenta limitaciones que conviene considerar dependiendo del objetivo del estudio a realizar (Pedrós-Alió, 2006).

Nuestro conocimiento de la distribución de microorganismos en la naturaleza es muy escaso. Las primeras hipótesis al respecto sugerían que los microorganismos se distribuyen por todo el planeta y las condiciones ambientales seleccionan aquellos que se desarrollan mejor en cada ambiente (“Everything is everywhere but the environment selects”; Baas-Becking, 1934). Recientemente se ha sugerido que la distribución de los microorganismos depende de múltiples factores y existe controversia sobre si los microorganismos siguen los mismos modelos ecológicos establecidos para organismos superiores (Prosser et al., 2007).

En la actualidad, existe debate sobre si es relevante hablar de biogeografía



**Figura 1.3.** Representación del número de individuos de cada taxón en una comunidad microbiana siguiendo el modelo propuesto por Curtis et al. (2002) y que supone la imagen que hoy en día se tiene para comprender la estructura de las comunidades microbianas.

microbiana (Horner-Devine et al. 2004; Whitfield, 2005; Martiny et al. 2006) o si, por el contrario, los microorganismos no estarían limitados por factores ambientales y podrían acceder a cualquier lugar del planeta.

Para comprender la importancia de las comunidades microbianas hemos de considerar que los microorganismos raramente se encuentran aislados, sino que normalmente viven en relación con otros formando comunidades microbianas. Dentro de estas comunidades puede haber distintos tipos de interacciones. Por ejemplo, son comunes las asociaciones en las que unos microorganismos utilizan los productos del metabolismo de otros y así se alcanza la mineralización completa de diversos polímeros orgánicos con la colaboración en serie de diversos microorganismos (Little et al., 2008). También pueden darse interacciones que conlleven intercambio de material genético, y con ello, la adquisición de posibles capacidades útiles para la adaptación al medio (West et al., 2007).

### **1.2.1. Análisis de las comunidades microbianas**

Las comunidades microbianas naturales resultan complejas y difíciles de estudiar debido, principalmente, a la elevada abundancia y diversidad de los microorganismos. Hoy en día, las comunidades microbianas se estudian, principalmente, utilizando las secuencias de los genes ARNr. Las secuencias se analizan clasificándolas en base a OTUs (unidad taxonómica operacional; “Operational Taxonomic Unit”; OTU). Una OTU incluye secuencias con un nivel de identidad determinado. Cada OTU correspondería a un filotipo diferente. El nivel de identidad del 97%, generalmente, podría corresponder al nivel taxonómico de especie (Vandamme et al., 1996). El porcentaje de identidad del 99% se suele utilizar para diferenciar microorganismos distintos pertenecientes a una misma especie (Zimmermann et al., 2005). Dependiendo

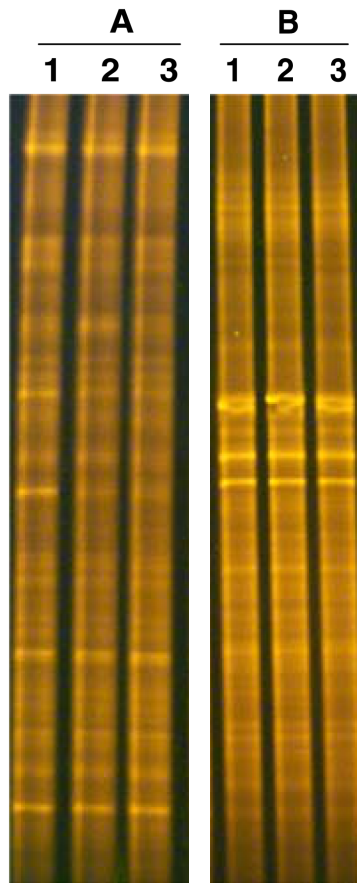
del análisis a realizar, otros porcentajes de identidad también han sido utilizados como 95% o 90% (Horner-Devine et al. 2004).

Una de las técnicas moleculares empleadas para el estudio de las comunidades microbianas son las técnicas de “fingerprinting”. Con este tipo de técnicas se puede obtener un perfil molecular de la comunidad microbiana (Muyzer et al., 1993). Entre ellas, una de las más utilizadas es la técnica PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Esta técnica consiste en la realización de un primer paso, en el que se procede a la amplificación por PCR del gen de interés (por ejemplo, ARNr 16S para bacterias), seguido de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, gracias a la cual obtenemos el perfil molecular de la comunidad (Figura 1.4). Esta técnica resulta útil para identificar los componentes mayoritarios de la comunidad (Muyzer et al., 1993; González et al., 2003) y para comparar comunidades microbianas o para estudiar las variaciones que experimenta una comunidad en respuesta a distintos tratamientos. La técnica PCR-DGGE permite visualizar y comparar distintos perfiles de comunidades microbianas de manera relativamente rápida y eficiente.

Las técnicas de secuenciación de ADN han experimentado un gran avance en los últimos años. No obstante, para el análisis de las comunidades microbianas mediante técnicas de secuenciación masiva de ADN, generalmente, el protocolo sigue incluyendo una amplificación previa, por ejemplo, de los genes ARNr 16S (amplicones) para comunidades bacterianas. Entre los ejemplos de plataformas de secuenciación masiva más utilizadas podemos mencionar 454 FLX de Roche (pirosecuenciación; ya descatalogado) o la plataforma de Illumina (MiSeq, HiSeq) (secuenciación por síntesis), entre otras, y continúan apareciendo nuevas plataformas de secuenciación a gran escala (Goodwin et al., 2016).

Dependiendo de cuál sea el objetivo del estudio a la hora de analizar las comunidades microbianas se utiliza una técnica u otra. Con la técnica de PCR-





**Figura 1.4.** Ejemplos de perfiles moleculares de comunidades microbianas obtenidos mediante PCR-DGGE. Los perfiles microbianos A y B (tres réplicas cada uno) corresponden a sedimentos de dos lagunas diferentes del Parque Natural de Doñana (España) (Portillo y González, 2008).

DGGE pueden compararse comunidades microbianas relativamente sencillas y obtener información sobre la distribución y dinámica de los miembros mayoritarios de esas comunidades, visualizando fácilmente la influencia de distintos tratamientos o condiciones experimentales.

### 1.3. Termófilos

Según su temperatura óptima de crecimiento, los organismos se pueden clasificar en tres grupos básicos: psicrófilos (temperatura óptima  $\leq 20^{\circ}\text{C}$ ), mesófilos (temperatura óptima entre  $20^{\circ}\text{C}$  y  $50^{\circ}\text{C}$ ) y termófilos (temperatura óptima  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ). Dentro del término “termófilo” se distingue entre termófilos moderados (temperatura óptima entre  $50^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$ ; o simplemente termófilos), termófilos extremos (temperatura óptima entre  $70^{\circ}\text{C}$  y  $80^{\circ}\text{C}$ ) e hipertermófilos (temperatura óptima  $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ) (Pikuta et al., 2007; Itoh y Iino., 2013). El límite superior de temperatura al que se ha demostrado el desarrollo de un microorganismo es  $121^{\circ}\text{C}$  (Takai et al., 2008). Aunque existen algunos organismos eucariotas capaces de sobrevivir hasta aproximadamente  $60^{\circ}\text{C}$ , la temperatura óptima de esos eucariotas no supera los  $45^{\circ}\text{C}$  (Clarke, 2014). Los organismos termófilos son mayoritariamente procariotas y pertenecen a los dominios *Bacteria* y *Archaea* (Figura 1.1).

Los microorganismos termófilos se distribuyen por todo el planeta y han sido detectados en ambientes muy diversos (Burgess et al., 2007). Algunos de estos ambientes presentan una alta actividad geotérmica, estos son, por ejemplo, fuentes termales, géiseres o solfataras, localizados en la corteza terrestre, o fuentes hidrotermales, localizadas en el fondo marino. En ambientes subterráneos también existen entornos adecuados para el desarrollo de termófilos, por ejemplo, reservorios de petróleo, lagos, minas o acuíferos. Por otra parte, la actividad del ser humano también crea ambientes propicios para el

desarrollo de termófilos como pilas de compost o diversos ambientes relacionados con tratamientos térmicos industriales (por ejemplo, en la industria alimentaria). También se han detectado microorganismos termófilos en suelos incluso en zonas templadas (Portillo et al., 2012) y frías (Marchant et al., 2002; Hubert et al. 2009).

El estudio de los microorganismos termófilos ha suscitado interés por varias razones. Desde el punto de vista evolutivo, varias observaciones han dado lugar a formular la hipótesis de que las primeras formas de vida pudieron ser termófilas (Stetter, 1996; Schwartzman y Lineweaver, 2004). Una de las observaciones sería que las ramas más cercanas a la raíz del árbol filogenético (Figura 1.1), tanto en el dominio *Bacteria* como en el dominio *Archaea*, se corresponden generalmente, con microorganismos termófilos e hipertermófilos. Los microorganismos termófilos podrían ayudarnos a desvelar en qué condiciones surgieron los primeros seres vivos y su evolución posterior.

Desde el punto de vista bioquímico los termófilos también suscitan gran interés, ya que para que estos microorganismos se desarrollen a temperaturas elevadas sus componentes celulares tienen que soportar estas altas temperaturas (Pikuta et al., 2007). Algunas biomoléculas, como por ejemplo enzimas resistentes a altas temperaturas, son de interés en biotecnología debido a que muchos procesos industriales son más eficientes si se llevan a cabo a altas temperaturas. Por tanto, el descubrimiento de nuevas enzimas termoestables facilitaría el desarrollo de numerosos procesos biotecnológicos y representa una importante fuente para la búsqueda de nuevos biocatalizadores.

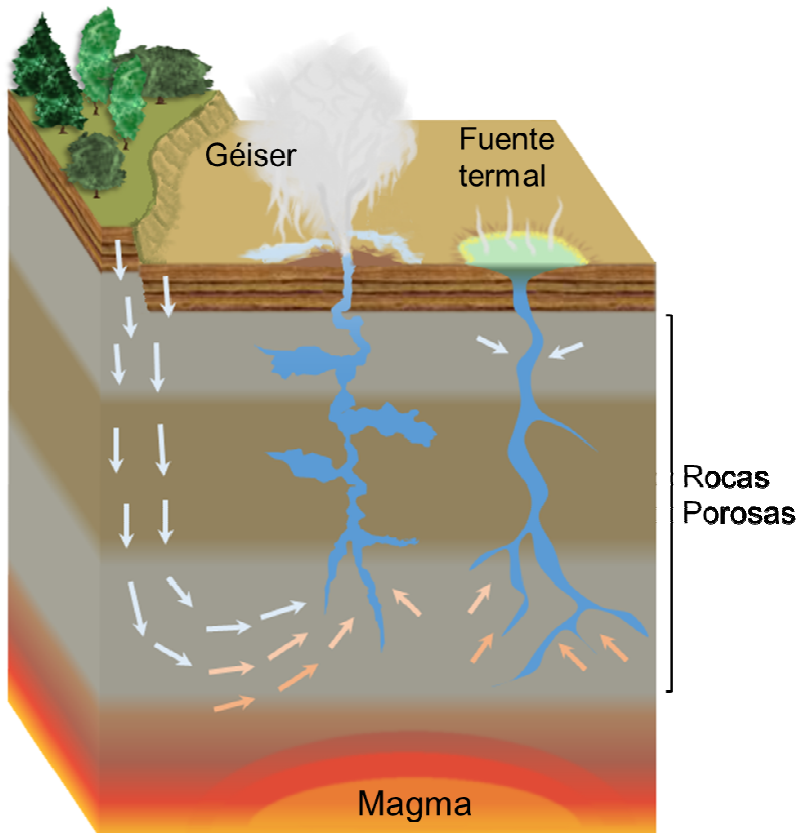
El papel que los microorganismos termófilos tienen en los ecosistemas, es decir, su importancia ecológica, también presenta interés para comprender como se desarrollan distintos procesos biogeoquímicos en condiciones extremas (Burgess et al., 2007).

## 1.4. Fuentes termales

Las fuentes termales (Figura 1.5) son afloramientos de agua a elevada temperatura. El proceso de formación de las fuentes termales requiere que se produzca una filtración de agua hacia el interior de la corteza terrestre a través de rocas de naturaleza porosa. Posteriormente, el agua se va calentando a medida que se acerca a zonas más internas de la corteza y al magma. La presión que alcanza el agua en estas condiciones propicia su afloramiento hacia la superficie a través de fisuras en la corteza terrestre. En ocasiones, estos afloramientos se producen en forma de vapor de agua como en los geiseres (Figura 1.5).

Las fuentes termales se localizan principalmente en las zonas limítrofes de las placas tectónicas en las que se divide la superficie terrestre (Figura 1.6) y que representan zonas de gran actividad geotérmica. Un ejemplo de fuentes termales muy conocido se encuentra en el Parque Nacional de Yellowstone (Estados Unidos). En estas fuentes termales se aisló el primer microorganismo termófilo extremo, *Thermus aquaticus*, y se realizaron los primeros estudios relacionados con la vida a altas temperaturas que marcaron un hito en Microbiología (Marsh y Larsen, 1953; Brock, 1967; Brock y Freeze, 1969). Otras zonas geográficas con fuentes termales son la península de Kamchatka (Rusia), caracterizada por una fuerte actividad volcánica, más de un centenar de fuentes termales y donde se han realizado numerosos estudios (Waltham, 2001; Mardanov et al., 2011; Wemheuer et al., 2013). La actividad geotérmica de esta zona continúa a lo largo del “anillo de fuego del Pacífico” que incluye áreas como el sureste asiático y la costa oeste del continente americano (Kearey et al., 2009).

Las características de las fuentes termales dependen de la naturaleza de las rocas por donde se produce la filtración y posterior emanación de agua. El proceso de filtrado de agua a alta temperatura puede resultar en la concentración en solución



**Figura 1.5.** Esquema de una zona geotérmicamente activa donde se observa una fuente termal y un géiser. Las flechas indican el flujo del agua hacia el interior de la corteza terrestre y su posterior calentamiento y ascenso a la superficie a través de rocas porosas o fisuras en forma de fuente termal o géiser.



**Figura 1.6.** Las placas tectónicas de la Tierra.

de distintos minerales y, por tanto, existen fuentes termales con características muy diversas en cuanto a su temperatura, composición química, pH, etc. (Burgess et al., 2007; Mehta y Satyanarayana, 2013). Por ejemplo, podemos encontrar valores de pH desde muy ácidos, como es el caso de la fuente termal de Pozzuoli (Italia; Häring et al., 2005) con un valor de pH de 1,5, hasta valores alcalinos alrededor de 10 o superiores, como en el caso de las fuentes termales de Tengchong (China; Xie et al., 2014). La acumulación de precipitados ricos en diversos minerales es muy característica alrededor de fuentes termales como en Yellowstone (Livo et al., 2007).

Otro ejemplo de área donde se puede encontrar un número elevado de fuentes termales es el sudeste asiático. Esta zona se encuentra muy cercana a la de contacto entre la placa tectónica Indo-Australiana y la placa Euroasiática (Figura 1.6). Tailandia se encuentra a 600-800 km de la zona de subducción de la placa India bajo la Euroasiática. La colisión entre estas dos placas causa gran actividad sísmica y una de sus consecuencias fue la formación de la cordillera del Himalaya. En Tailandia existen alrededor de 140 fuentes termales cuya temperatura varía desde 32 a 99°C. El 62% de las fuentes termales tienen una temperatura por encima de los 50°C y la mayoría de ellas están localizadas en la parte noroeste del país. En cuanto al pH, el 22% presentan valores de pH aproximadamente neutros (pH 6-7.5) y la mayoría (70%) moderadamente alcalinos (pH 7.5-9). Sólo un 8% de las fuentes termales de Tailandia presentan pH alcalino extremo (pH 9-10). Las fuentes termales situadas al norte, al contrario que las del sur, contienen un alto contenido en sílice y hierro (Subtavewung et al., 2005). Las condiciones constantes de pH y temperatura elevada junto a su buena conservación en sus entornos naturales hacen que estos ambientes sean adecuados para el estudio de microorganismos termófilos y sus comunidades (Tirawongsaroj et al., 2008).

## **1.5. Comunidades microbianas termófilas**

El concepto generalizado en Ecología Microbiana es que al aumentar la temperatura la diversidad de las comunidades microbianas disminuye (Meyer-Dombard, et al., 2005; Allewalt et al., 2006; Miller et al., 2009). Sin embargo, ello no impide que exista una elevada diversidad de microorganismos termófilos (Ward, 2006). Las comunidades microbianas termófilas pueden representar un buen modelo para estudiar distintos fenómenos de la dinámica y distribución de microorganismos en la naturaleza (Jessup et al., 2004), incluyendo la influencia de ciertos factores ambientales. Entre los factores que podrían explicar la distribución de los microorganismos y la estructura de las comunidades microbianas en fuentes termales podemos citar, por ejemplo, el pH, la composición química, la concentración de sulfuro y especialmente la temperatura (Purcell et al., 2007; Hall et al., 2008; Miller et al., 2009; Hou et al., 2013; Wang et al., 2013)

En las fuentes termales, una estrategia de organización que utilizan algunos microorganismos es la de formar tapetes microbianos. Los tapetes microbianos son formas de crecimiento en las que uno o varios microorganismos crecen asociados en forma de biopelículas adheridos a superficies. Estas biopelículas están formadas por las células microbianas incluidas en una matriz extracelular compuesta principalmente por exopolisacáridos. En estos tapetes microbianos las diferentes especies se distribuyen en el espacio y el tiempo acorde a distintos factores ambientales (como la temperatura, entre otros) y a sus capacidades funcionales, resultando en comunidades especializadas para vivir en estos hábitats con un alto grado de interacción entre sus componentes (Pikuta et al., 2007).



Los tapetes microbianos han sido objeto de numerosos estudios (Moyer et al., 1995; Skirnisdottir et al., 2000; Hongmei et al., 2005; Miller et al., 2009; Portillo et al., 2009a y b; Kubo et al., 2011; Bohorquez et al., 2012; Mackenzie et al., 2013) y, generalmente, se caracterizan por la dominancia de Cyanobacteria y Chloroflexi (Kanokratana et al., 2004; Lau et al., 2009; Miller et al., 2009; Portillo et al., 2009a y b). Se ha observado que presentan una estructura vertical de la comunidad microbiana de manera que las capas superiores, expuestas a la luz directa, están dominadas por cianobacterias (bacterias especializadas en la fotosíntesis) que poseen clorofilas y suelen proporcionar coloración verde. Las capas más internas del tapete están dominadas mayoritariamente por bacterias pertenecientes a la división Chloroflexi, que presentan alto contenido en carotenoides y proporcionan coloraciones rojizas a las capas internas. Chloroflexi desempeña principalmente un metabolismo fotoheterótrofo en estos tapetes microbianos (Boomer, et al., 2000; Mehta y Satyanarayana, 2013). Actualmente, existe discusión acerca de la distribución y relaciones ecológicas de estos dos grupos (Ward, 2006; Miller et al., 2009; Portillo et al., 2009a y b).

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos diverso y distribuido en una amplia gama de hábitats (Abed et al., 2009) que juegan un papel importante en los ciclos globales del carbono y del nitrógeno (Whitton, 2012; Dittmann, et al., 2015). Como característica destacable, las cianobacterias son los únicos microorganismos procariotas que realizan fotosíntesis oxigénica (que es aquella en la que se libera oxígeno) aunque algunas especies también pueden realizar fotosíntesis anoxigénica usando sulfuro como donador de electrones. Muchas de ellas fijan nitrógeno atmosférico y algunas pueden realizar fermentaciones (Abed, et al., 2009). El género más común de Cyanobacteria en los ambientes termales es *Thermosynechococcus* (Portillo et al., 2009a; Mehta y Satyanarayana, 2013; Wang et al., 2013), entre otros, como por ejemplo *Leptolyngbya* (Amarouche-Yala, et al., 2014).

Los microorganismos incluidos en la división Chloroflexi suelen mostrar formas filamentosas que incluyen gran diversidad metabólica, con representantes capaces de comportarse como fotoautótrofos anoxigénicos o fotoheterótrofos y de vivir en aerobiosis o anaerobiosis (Garrrity et al., 2001; Hugenholtz y Stackebrandt, 2004). De entre los subgrupos que componen esta división, la clase Chloroflexi se caracteriza porque la mayoría de los representantes conocidos presentan un metabolismo fototrófico. Ejemplos comunes de géneros pertenecientes a Chloroflexi encontrados en tapetes microbianos de fuentes termales son *Chloroflexus* y *Roseiflexus*.

En Tailandia, principalmente al noroeste del país, se han realizado estudios para conocer la distribución de cianobacterias en distintas fuentes termales que abarcan un amplio rango de temperatura (30-80°C). Sompong et al. (2005 y 2008) concluyeron que la temperatura era un factor influyente en su distribución (Sompong et al., 2005; Sompong et al., 2008). Portillo et al. (2009a) analizaron tapetes microbianos dominados por Cyanobacteria y Chloroflexi a temperaturas entre 50 y 57°C al este de Tailandia. Otros estudios en fuentes termales del norte de Tailandia han apuntado a la importancia de la temperatura en la distribución de los microorganismos, pero se han centrado específicamente en el estudio de microorganismos hipertermófilos (>75°C) (Purcell et al, 2007). En la plataforma Tibetana, se ha observado que Cyanobacteria y Chloroflexi son los componentes dominantes en fuentes termales por debajo de 70°C (Wang et al. 2013). En algunas fuentes termales de India entre 54 y 69°C se ha detectado una baja abundancia de Cyanobacteria y Chloroflexi (Ghelani et al., 2015; Mangrola et al., 2015; Singh y Subudhi, 2016).

## **1.6. Aislamiento y caracterización de bacterias**

La obtención de cultivos fue un hito importante en Microbiología. A pesar de los avances en las técnicas moleculares, el aislamiento de microorganismos en cultivos puros (axénicos), es decir, que contiene sólo un tipo de microorganismo es necesario para una adecuada clasificación y caracterización del mismo (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Palleroni, 1997).

Para crecer un microorganismo en el laboratorio tenemos que proporcionarle condiciones adecuadas para su desarrollo, lo cual no siempre es trivial. Una cuestión importante a tener en cuenta es si el microorganismo es aerobio (vive en presencia de oxígeno), microaerófilo (crece a baja concentración de oxígeno) o anaerobio (vive en ausencia de oxígeno), ya que requerirá condiciones de cultivo e incubación específicas. Los nutrientes necesarios y las condiciones físico-químicas han de ser favorables para que ese microorganismo pueda desarrollarse en el laboratorio. Muchos microorganismos termófilos extremos e hipertermófilos son anaerobios.

El concepto de especie en Microbiología es controvertido y muy discutido en taxonomía. Ello se debe a la dificultad existente en definir los límites a la hora de diferenciar microorganismos y la variabilidad existente entre ellos. El concepto actual de especie microbiana apunta a la necesidad de caracterizar fenotípica y genotípicamente a los microorganismos utilizando lo que se ha denominado una aproximación polifásica (Rosselló-Mora y Amann, 2001). En términos generales, los microorganismos que constituyen una especie han de presentar características fenotípicas similares manteniendo un cierto grado de similitud o proximidad entre sus genomas.

En un principio, la caracterización de un microorganismo consistía en realizar

una descripción fenotípica de estos microorganismos que incluía un análisis de sus propiedades fisiológicas y condiciones de crecimiento. A lo largo de la historia se han incorporado nuevas técnicas de análisis bioquímicos (perfil de ácidos grasos, determinación de productos finales del metabolismo) y técnicas basadas en el material genético de los microorganismos (hibridación ADN-ADN, contenido en G+C del ADN, secuencia de genes de ARN ribosómico, secuenciación y comparación de genomas). El acceso a la secuencia completa del ARNr supuso un gran paso para llevar a cabo una rápida aproximación a la posición taxonómica de un microorganismo, incluso sin necesidad de ser cultivado. Comparando dos microorganismos, una homología menor de 97% en la secuencia de ARNr 16S sugiere la posibilidad de que pertenezcan a especies diferentes (Vandamme et al., 1996). Sin embargo, la secuencia de los genes ARNr exclusivamente es insuficiente para describir una especie.

Dentro de los métodos genotípicos, determinar el grado de similitud entre genomas se considera clave para diferenciar o agrupar microorganismos en especies determinadas. Este proceso se ha realizado experimentalmente mediante la hibridación de secuencias de ADN de dos cepas a comparar, de manera que un valor de hibridación menor del 70% era el límite considerado para distinguir especies. Con el desarrollo de técnicas de secuenciación masiva de ADN y, por tanto, la posibilidad de disponer de gran cantidad de secuencias, incluso genomas microbianos completos, se están empezando a plantear nuevos procedimientos para la distinción entre microorganismos y su clasificación taxonómica (Vandamme y Peeters, 2014). Uno de los más usados es el análisis comparativo ANI (del inglés, Average Nucleotide Identity) (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Richter y Rossello-Mora 2009) que consiste en determinar el porcentaje de identidad entre secuencias de ADN homólogas de distintos microorganismos. Un porcentaje por debajo del 95% en el análisis ANI se considera que es el resultado de la comparación de especies microbianas diferentes. Otro método genotípico utilizado en la diferenciación de

microorganismos es la determinación del contenido de guanosina más citosina (G+C) en su genoma. Éste es un método estándar discriminatorio que se considera que no debería variar más de un 3% dentro de una misma especie.

Los métodos fenotípicos constituyen la base de la descripción funcional de los taxones bacterianos. Las características fenotípicas de los microorganismos comprenden características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Muchas de estas características por separado han demostrado ser irrelevantes para el reconocimiento de un taxón, sin embargo, en su conjunto, proporcionan información descriptiva que nos permiten caracterizar microorganismos y su diferenciación funcional. La morfología de una bacteria incluye tanto características celulares (forma, esporas, tamaño, flagelos, cuerpos de inclusión, tinción de Gram) como de sus colonias (color, forma y dimensiones), pero la relativamente baja diversidad morfológica bacteriana no permite clasificar taxonómicamente un microorganismo, si bien es un aspecto más a tener en cuenta en su caracterización. Las características fisiológicas y bioquímicas incluyen datos de crecimiento en diferentes condiciones, la presencia o actividad de varias enzimas, la capacidad para metabolizar distintos compuestos y la composición estructural del microorganismo estudiado.

Los métodos fenotípicos también incluyen técnicas quimio-taxonómicas. El término "Quimiotaxonomía" se refiere a la aplicación de métodos analíticos que permitan diferenciar microorganismos, como por ejemplo, el perfil de ácidos grasos o la determinación de productos del metabolismo secundario. La utilización del análisis cualitativo de ácidos grasos para diferenciar entre microorganismos y, por tanto, su utilización en taxonomía es bien conocida y se viene aplicando desde la década de los 60 (Abel et al., 1963; Shaw, 1974). Aunque se pueden analizar distintos lípidos, el análisis de ácidos grasos presentes en las membranas celulares es el más frecuente. Los ácidos grasos más frecuentes en las bacterias están entre 10 y 20 átomos de carbono, siendo

generalmente dominantes aquellos entre 15 y 19 átomos de carbono (Shaw, 1974). La variabilidad en la longitud de la cadena, la posición de dobles enlaces y los grupos sustituyentes han demostrado ser muy útiles para la caracterización de taxones bacterianos (Suzuki et al., 1993). La determinación de los productos finales del metabolismo, como los ácidos orgánicos o determinados gases (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S, etc.), es otro tipo de técnicas utilizadas para la clasificación en taxonomía (Goodfellow y Minnikin, 1985; Priest y Austin, 1993). Sin embargo, aún no se conocen para muchas especies lo que limita su utilización para distinguir microorganismos.

En las fuentes termales de la zona de Tailandia y sus alrededores (principalmente el sudeste de China y noreste de India) se han publicado alrededor de medio centenar de trabajos en los que se citan aislamientos de microorganismos termófilos bien con el objetivo de caracterizarlos bien para la búsqueda de alguna enzima con interés biotecnológico (Tabla 1.1). La mayoría de los trabajos se han realizado en la zona del sureste de China en la zona de Tengchong (Hedlund, et al., 2012). Gracias a estos estudios se han obtenido más de 200 aislados, en su mayoría Firmicutes. Los aislados pertenecen a las divisiones bacterianas Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Nitrospirae, Proteobacteria, Thermotogae y al dominio Archaea. La mayoría de los Firmicutes presentaban temperatura óptima de crecimiento por debajo de los 65°C. En un estudio realizado en varias fuentes termales de Tailandia, se aislaron 148 bacterias que mostraban similitud con el género *Bacillus*, entre ellos se encontraban algunos cuya temperatura óptima de crecimiento alcanzaba 70°C (Pakpitcharoen et al., 2008). En el caso de Deinococcus-Thermus, la mitad de los aislados presentan una temperatura de crecimiento óptimo superior a 70°C. Todas las arqueas termófilas aisladas presentaban temperaturas óptimas de crecimiento por encima de los 65°C. También se han realizado estudios en los que se han aislado varias cianobacterias en distintas fuentes termales de Tailandia (Sompong et al., 2008).

De entre todos los aislados, sólo las arqueas *Sulfolobus tengchongensis* (Xiang et al., 2003) y *Pyrococcus* PK 5017 (Kanoksilapatham et al., 2012) y una bacteria perteneciente a la división Thermotogae, *Thermotoga* sp. cepa PD524 (Kanoksilapatham et al., 2015), presentan temperaturas óptimas de crecimiento a 80°C o más. Estos datos indican el bajo número de cultivos de microorganismos termófilos extremos obtenidos del sureste asiático a pesar de la abundancia de fuentes termales y la gran actividad geotérmica existentes en esta zona.

**Tabla 1.1.** Relación de aislados en fuentes termales de Tailandia y alrededores.

Aislados	Localización	Condiciones de Temperatura <sup>1</sup>	Referencia
<b>Actinobacteria</b>			
<i>Streptomyces calidiresistens</i> YIM 78087	Tengchong, Yunnan, China	28-50°C (37-45°C)	Duan et al., 2014
<b>Bacteroidetes</b>			
<i>Cecembia rubra</i> YIM 78110	Tengchong, Yunnan, China	30-50°C (37-45°C)	Duan et al., 2015
<b>Cyanobacteria</b>			
Varias cianobacterias (20)	Tailandia	ND	Sompong et al., 2008
<b>Deinococcus-Thermus</b>			
<i>Meiothermus rosaceus</i> RH9901	Tengchong, Yunnan, China	40-70°C (55°C)	Chen et al., 2002
<i>Meiothermus roseus</i> YIM 71031	Tengchong, Yunnan, China	37-65°C (50°C)	Ming et al., 2015
<i>Thermus amyloliquefaciens</i> YIM 77409	Eryuan, Yunnan, China	50-70°C (60-65°C).	Yu et al., 2015
<i>Thermus arciformis</i> TH92	Laibin, Guangxi, China	40-77°C (70°C)	Zhang et al., 2010
<i>Thermus caliditerrae</i> YIM 77925	Tengchong Yunnan, China	50-70°C (65°C)	Ming et al., 2014
<i>Thermus rehai</i> RH99-GF7504	Tengchong, Yunnan, China	40-80°C (65-70 °C)	Lin et al., 2002
<i>Thermus</i> 2S	Chiang Mai, Tailandia	(60°C)	Kanasawud et al. 1992
<i>Thermus</i>	Tengchong, Yunnan, China	ND	Lin et al., 2005
<b>Firmicutes</b>			
<i>Acinetobacter</i> AGP-02	Birbhum, Bengala, India	40-65°C (50°C)	Ghati et al., 2013
<i>Bacillus cereus</i> AGP-03		40-70°C (55°C)	
<i>Geobacillus</i> AGP-04		40-75°C (60°C)	
<i>Aeribacillus pallidus</i> TD1	Tailandia	30-67°C (55-60°C)	Yasawong et al., 2011
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> Tc-4-1	Tengchong, Yunnan, China	ND	Chen et al., 2011
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> Tc-12-31		ND	Zhang et al., 2008
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> YNTC-1	Tengchong, Yunnan, China	40-70°C (55°C)	Ding et al., 2008



<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> TC-2		45-70°C (55°C)	Wu et al., 2008
<i>Alicyclobacillus</i>	Tengchong, Yunnan, China	(43-52°C)	Cheng-Ying et al., 2004
<i>Anoxybacillus eryuanensis</i> E-112	Eryuan, Yunnan, China	35-70°C (55°C)	Zhang et al., 2011
<i>Anoxybacillus tengchongensis</i> T-11		30-75°C (50°C)	
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i> 3nP4	China	38-66°C (57-60°C)	Zhang et al., 2013
<i>B. pumilus</i>	Tengchong, Yunnan, China	37-70°C (55°C)	Ding et al., 2010
<i>B. halodurans</i>	Tengchong, Yunnan, China	ND	Li et al., 2004
<i>Bacillus</i> (22 aislados)	Nayagarh, Odisha, India	ND	Panda et al., 2013
<i>Bacillus</i> (148 aislados)	Tailandia (76)	(45-70°C)	Pakpitcharoen et al., 2008
<i>Caldalkalibacillus thermarum</i> HA6	Tengchong, Yunnan, China	45-65°C (60°C)	Xue et al., 2006
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>tengcongensis</i> MB4T	Tengchong, Yunnan, China	50-80°C (75°C)	Xue et al., 2001 Fardeau et al., 2004
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	Tengchong, Yunnan, China	60-80°C (70°C)	Lu et al., 2009
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> N7	Bengala, India	ND	Bose et al., 2016
<i>Geobacillus</i> A27	Tengchong, Yunnan, China	(60°C)	Wang et al., 2011
<i>Geobacillus</i> GSEY01	Tengchong, Yunnan, China	(60°C)	Yunlin et al., 2010
<i>Laceyella sediminis</i> RHA1	Tengchong, Yunnan, China	28-65°C (55°C)	Chen et al., 2012
<i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i> YN22	Tengchong, Yunnan, China	25-60°C (53°C)	Ding et al., 2007
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> BSB-33	Bengala, India	50-75°C (60°C)	Bhowmick et al., 2009 Bhattacharya et al., 2015
<i>Thermosyntropho tengcongensis</i> L-60	Tengchong, Yunnan, China	55-70 °C (60°C)	Zhang et al., 2012
Bacteria BKH1	Bengala, India	45-75°C (65°C)	Biswas et al., 2010
<b>Nitrospirae</b>			
<i>Nitrospira</i>	Tengchong, Yunnan, China	ND	Edwards et al., 2013

## Capítulo 1

<b>Proteobacteria</b>			
<i>Caldimonas meghalayensis</i> AK31	Megalaya, India	25-55°C (45°C)	Rakshak et al., 2013
<i>Crenalkalicoccus roseus</i> YIM 78023	Tengchong, Yunnan, China	20-60°C (40-50°C)	Ming et al., 2016
<i>Crenobacter luteus</i> YIM 78141	Tengchong, Yunnan, China	10-55°C (40-50°C)	Dong et al., 2015
<i>Roseomonas alkaliterrae</i> YIM 78007	Tengchong, Yunnan, China	5-55°C (40-50°C)	Dong et al., 2014b
<i>Zhizhongheella caldifontis</i> YIM 78140	Tengchong, Yunnan, China	10-55°C (40-50°C)	Dong et al., 2014a
Bacteria BKH2	Bengala, India	(65°C)	Sarkar et al., 2015
Bacteria BKH3	Bengala, India	ND	Chaudhuri et al., 2016
<b>Termotogae</b>			
<i>Thermotoga</i> y <i>Fervidobacterium</i>	Tailandia	ND	Keawram et al., 2016
<i>Thermotoga</i> PD524	Tailandia	70-85°C (80°C)	Kanoksilapatham et al., 2015
<b>Archaea</b>			
<i>Acidianus manzaensis</i> YN25	Tengchong, Yunnan, China	50-85°C (65°C)	Ding et al., 2011 Huan et al., 2008
<i>Acidianus tengchongensis</i> S5	Tengchong, Yunnan, China	55°-80°C (70°C)	He et al., 2004
<i>Metallosphaera cuprina</i> Ar-4	Tengchong, Yunnan, China	55-75°C (65°C)	Liu et al., 2011
<i>Sulfolobus tengchongensis</i> RT8-4	Tengchong, Yunnan, China	(80°C)	Xiang et al., 2003
<i>Sulfolobus</i> K4-1	Tengchong, Yunnan, China	(75°C)	Jing et al., 2008
<i>Sulfolobus</i>	Tengchong, Yunnan, China	ND	Han et al., 2010
<i>Pyrococcus</i> PK 5017	Parque Nacional Huai Nam Dang, Tailandia	75-105°C (95-100°C)	Kanoksilapatham et al., 2012

<sup>1</sup> Rango de temperatura de crecimiento. Entre paréntesis, temperatura óptima de crecimiento. No Determinado, ND.

## 1.7. Genómica

La genómica es la disciplina que estudia los genomas (secuencia completa del ADN de un organismo) de los seres vivos. El término fue propuesto por Thomas H. Roderick en 1986 para englobar una nueva disciplina científica basada en el mapeado, secuenciación y análisis del ADN (Yadav, 2007). La genómica ha cambiado significativamente las investigaciones en Microbiología desde que en 1995 se secuenció el primer genoma completo de una bacteria, *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995). Aunque el verdadero auge de la genómica tuvo lugar con los avances en las técnicas de secuenciación masiva y con el desarrollo de técnicas informáticas para su análisis (Hall, 2007). Esto ha llevado a un avance significativo en las investigaciones actuales, hablándose de “era de la genómica”.

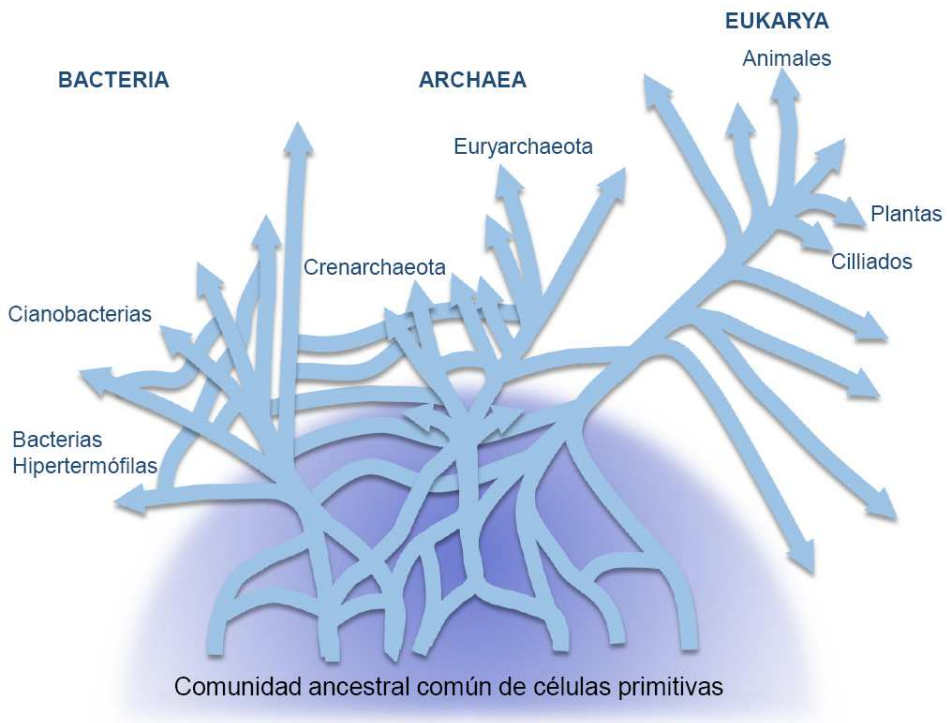
La determinación de la secuencia completa de un microorganismo representa un paso decisivo para comprender la relación entre la información que alberga el ADN y la fisiología del microorganismo, mediante el estudio de los genes que contiene. Además el análisis de los genomas nos permite conocer aspectos bioquímicos, evolutivos, así como acceder más fácilmente a genes o secuencias de ADN con interés biotecnológico. En la actualidad disponemos de gran cantidad de genomas de miles de microorganismos (<http://genome.jgi.doe.gov>), ahora la cuestión está en saber interpretar esa enorme cantidad de información (Pedrós-Alió, 2006). Por ejemplo, la gran cantidad de genomas disponibles ha fomentado enormemente la posibilidad de realizar estudios comparativos. Comparando genomas de distintos microorganismos se han podido deducir aspectos interesantes de su historia evolutiva y, por ejemplo, detectar fenómenos de intercambio de material genético entre distintos microorganismos.

## 1.8. Transferencia horizontal de genes

Los primeros indicios de transferencia de genes entre microorganismos se observaron en cepas de *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928). En estos experimentos se observó que el carácter de virulencia podía pasar de unas cepas a otras de esta especie y abrió las puertas a investigaciones para conocer los mecanismos y consecuencias de la transferencia de ADN. Décadas más tarde se observó que las transferencias de genes se producían incluso entre organismos de especies diferentes (Syvanen, 1985) y, en la actualidad, está aceptada la elevada promiscuidad existente en el intercambio de ADN entre microorganismos (Frost et al., 2005).

En este contexto, a principios de los años 90 nace el concepto de transferencia horizontal de genes (HGT, Horizontal Gene Transfer), refiriéndose a la transferencia de fragmentos de ADN entre distintas especies. Estas observaciones hicieron cambiar la idea tradicional de árboles filogenéticos en forma ascendente, proponiéndose árboles filogenéticos para genes determinados con ramas entrecruzadas que adquieren apariencia de red (Figura 1.7) (Doolittle, 2000).

La HGT representa un mecanismo que acelera el curso de la evolución, especialmente en procariotas (Hilario y Gogarten, 1993; Frost et al., 2005). Los procesos de transferencia horizontal tienen gran relevancia en la estructura del genoma de los microorganismos y en su fisiología. Como resultado de estos procesos los microorganismos pueden ganar o perder genes o capacidades funcionales. Un ejemplo típico es la incorporación de genes de resistencia a antibióticos o de virulencia, o delección/disrupción de genes al eliminarse o insertarse fragmentos de ADN (Darmon y Leach, 2014). Estos cambios pueden ser importantes para la adaptación de los seres vivos a determinadas condiciones



**Figura 1.7.** Esquema del árbol de la vida con aspecto de red que representa las relaciones evolutivas de los seres vivos influenciadas por fenómenos de transferencia horizontal.

de su medio ambiente. Existen evidencias de una alta proporción de intercambio de genes entre microorganismos termófilos (van Wolferen et al., 2013; Urbietta et al., 2015).

Los primeros estudios de HGT utilizaban métodos comparativos basados en la detección de diferencias en la distribución filogenética de árboles construidos con genes determinados frente a árboles de genes de ARNr. Gracias al avance en las técnicas de secuenciación del ADN y a la facilidad actual para obtener las secuencias de los genomas, el estudio de los procesos de HGT ha experimentado un gran avance (Koonin y Galperin, 1997). Esto ha impulsado, a su vez, el desarrollo y aplicación de nuevos métodos para estudiar HGT que han mejorado la fiabilidad de los análisis. Entre estos métodos podemos mencionar las comparaciones basadas en la determinación del contenido G+C, la frecuencia de uso de codones, la frecuencia de tetranucleótidos u otros oligonucleótidos y el empleo de índices de similitud. De esta forma, estudios comparativos de genes o regiones del genoma que difieran en los valores de estos parámetros dentro de taxones determinados indicarían posibles fenómenos de HGT (Lawrence y Ochman, 2002; Dufraigne et al., 2005).

Todos estos métodos presentan limitaciones ya que se desconoce estrictamente hablando la historia del genoma de cualquier microorganismo. Las estimaciones realizadas dependen de los genomas y genes disponibles, que son los que se utilizan como referencia en estos análisis, y aún estamos lejos de tener una representación completa de la inmensa diversidad genética y taxonómica existente en el mundo microbiano. Otro factor que limita la detección de fenómenos de HGT se conoce con el nombre de “amelioration”. Este fenómeno representa el proceso por el cual un fragmento de ADN transferido adquiere progresivamente características (frecuencia del uso de codones, contenido en G+C, tasa de mutación) propias del genoma del microorganismo donde se ha insertado (Lawrence y Ochman, 1997). Por tanto, un evento ancestral de HGT

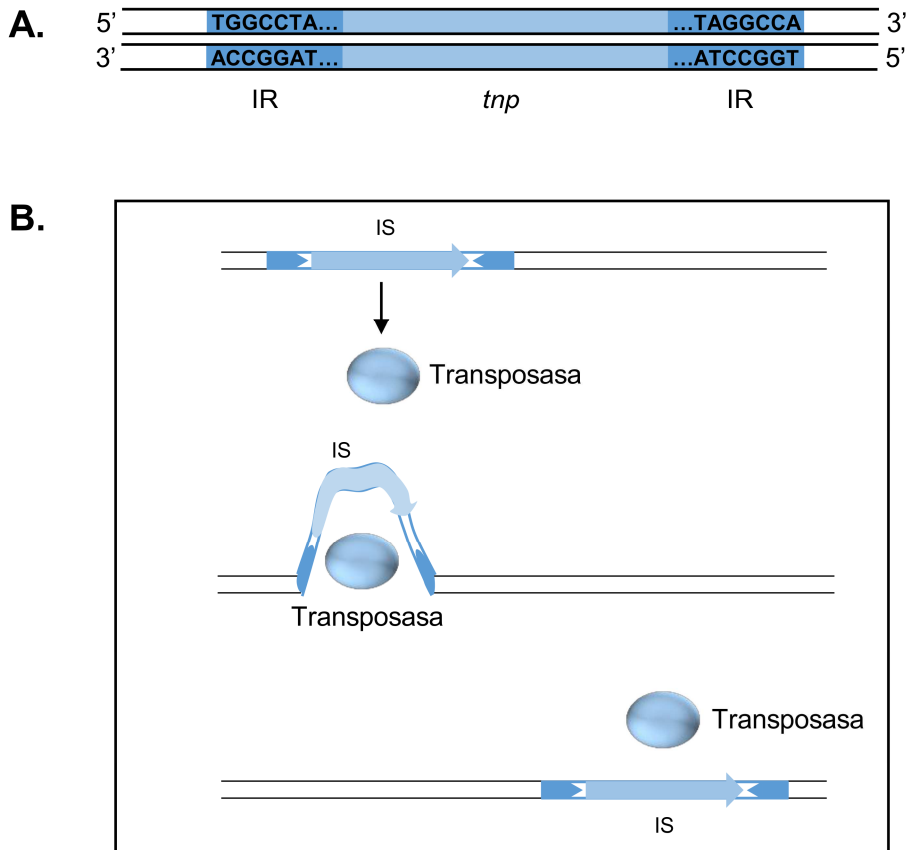
podría llegar a ser indetectable. En los últimos años, se han realizado varios estudios para evaluar los distintos métodos de detección de HGT concluyendo que la combinación de distintos métodos mejora significativamente la fiabilidad en los análisis de HGT (Becq et al., 2010; Ravenhall et al., 2015).

Los fenómenos de transferencia horizontal entre especies alejadas filogenéticamente son los más interesantes. Entre especies filogenéticamente cercanas es difícil determinar la ocurrencia de HGT. Existen muchas evidencias de fenómenos de HGT entre microorganismos pertenecientes a divisiones filogenéticamente distantes (Caro-Quintero, y Konstantinidis, 2015). Algunos estudios parecen indicar que estos fenómenos de HGT podrían concentrarse entre grupos taxonómicos concretos (Bansal et al., 2013; Beiko et al., 2005). Como ejemplos están el caso entre Epsilon-Proteobacteria y Aquificae (Boussau et al., 2008), entre Firmicutes y Thermodesulfobacteria o Firmicutes y Archaea (González y Robb, 2000; Sant’Anna et al., 2015), entre otros.

### **1.8.1. Transposasas**

En la transferencia de fragmentos de ADN entre células podría tener un papel importante la existencia de elementos genéticos móviles (MGE; “Mobile Genetic Elements”) que directamente podrían influir en fenómenos de HGT. Los MGE son elementos del genoma que tienen la capacidad de moverse o transferirse de una parte a otra del genoma de una célula o de células diferentes (Siguier et al., 2014). El estudio de los MGE presentes en un genoma nos podría proporcionar información sobre la historia evolutiva de un genoma.

Como ejemplos de MGE podemos citar a los plásmidos, los bacteriófagos, o las secuencias de inserción (Insertion Sequence; IS). Las ISs son los MGE autónomos más sencillos. Estas secuencias constan de un gen que codifica una transposasa y, generalmente, unas secuencias repetitivas cortas (IR, Inverted



**Figura 1.8.** Ejemplo de la estructura de las Secuencias de Inserción y mecanismo de transposición. **A.** Estructura típica de una secuencia de inserción, incluyendo el gen que codifica la transposasa (*tnp*) flanqueada en sus extremos por secuencias repetitivas invertidas (Inverted Repeat; IR). **B.** ejemplo de mecanismo de transposición de una IS en el que se observa como toda la IS, incluido las secuencias de los extremos (azul más oscuro) se transfieren al punto de inserción localizado en otra parte del genoma.



Repeat) flanqueando dicho gen en ambos extremos (Figura 1.8A). La autonomía de las ISs se debe a la transposasa, que tras reconocer las secuencias repetitivas situadas a los extremos de la IS, sería responsable de su escisión e inserción en otro lugar del genoma. Esta transferencia generalmente incluye las secuencias repetitivas de los extremos en el punto de inserción (Figura 1.8B).

Existen diferentes tipos de IS que se clasifican en distintas familias en base a varias características, por ejemplo, la longitud del gen de la transposasa, el número de secuencias codificantes (ORF; Open Reading Frame; marco abierto de lectura), el tipo de secuencia repetitiva en los extremos, el mecanismo de transposición y los aminoácidos clave en este proceso. Sin embargo, el peso de la clasificación recae principalmente en la secuencia del gen de la transposasa y en su similitud con grupos previamente establecidos (Siguier et al., 2014). Las ISs han sido clasificadas hasta ahora en 26 familias (Siguier et al., 2014).

Las secuencias repetitivas que flanquean las ISs también son una característica clave en la clasificación de las ISs. Existen principalmente dos tipos. Las más comunes son las IRs que se encuentran en la mayoría (90%) de las familias clasificadas (Figura 1.8A). Otro tipo de secuencias flanqueantes consiste en secuencias repetitivas palindrómicas, que forman una estructura en forma de bucle en el proceso de escisión de la IS. Una característica importante a tener en cuenta es que las ISs pueden incluir genes colindantes al punto de inserción que pueden quedar integrados en la IS.

Las ISs, a pesar de ser consideradas en principio MGE intracelulares, pueden insertarse en plásmidos o bacteriófagos y pueden ser transferidas a otras células (Siguier et al., 2014; Darmon y Leach, 2014). Se ha observado que las ISs tienen una probabilidad relativamente alta de ser transferidas entre células (Wagner et al., 2006; Hooper et al., 2009; Darmon y Leach, 2014). Esto puede explicarse porque las IS, al tener la capacidad de escindirse del genoma, pueden, además,

representar un material genético altamente susceptible de ser transferido por diferentes mecanismos.

## **1.9. Termoestabilidad molecular**

Los microorganismos termófilos, como hemos mencionado, se desarrollan a temperaturas elevadas. Estos microorganismos utilizan básicamente las mismas biomoléculas (proteínas, lípidos, hidratos de carbono y otros metabolitos) que los demás seres vivos. Sin embargo, muchas de estas biomoléculas son inestables a altas temperaturas, por lo que es importante conocer qué estrategias utilizan los microorganismos termófilos para poder desarrollarse a altas temperaturas. Para su introducción, podríamos distinguir las biomoléculas según su tamaño en macromoléculas (por ejemplo, proteínas, lípidos, ADN) y en otras biomoléculas de bajo peso molecular (por ejemplo, ATP y NAD).

### **1.9.1. Macromoléculas**

La mayoría de los estudios relacionados con la estabilidad de biomoléculas a altas temperaturas se han centrado en las proteínas. Las estrategias que adoptan los termófilos para mantener estables sus proteínas pueden ser muy variadas, por ejemplo, una mayor proporción de aminoácidos hidrofóbicos, mayor proporción de residuos implicados en estructuras  $\alpha$ -hélice, mayor frecuencia de aminoácidos con carga, mayor número de interacciones entre residuos, es decir, modificaciones que generan moléculas más compactas (Kumar et al., 2010). Sin embargo, ninguna de las estrategias mencionadas es universal (Vieille y Zeikus, 2001).

Otra posible estrategia de estabilización de proteínas es la utilización de solutos compatibles. Estas pequeñas moléculas (azúcares, polialcoholes, aminoácidos y

derivados) son sintetizadas en condiciones de estrés osmótico (da Costa et al., 1998; Calderón et al., 2004) pero también en condiciones de estrés térmico en microorganismos hipertermófilos (Santos y Da Costa, 2002; Faria et al., 2008; Borges et al., 2010; Empadinhas y da Costa, 2011).

Otras macromoléculas de interés en la termoestabilidad de los microorganismos son los lípidos y los ácidos grasos que los constituyen. La temperatura parece tener un efecto relevante sobre las propiedades fisicoquímicas de los lípidos de las membranas. Los enlaces éter, característicos en arqueas, son mucho más resistentes a la oxidación y a las altas temperaturas que los enlaces éster de bacterias (Koga, 2012). En bacterias se ha demostrado que la composición de lípidos de membrana puede variar enormemente dependiendo de las condiciones de crecimiento, cambiando así diversas características fisicoquímicas de la membrana, como su fluidez y la permeabilidad a iones y diversos componentes (Driessen y Albers, 2007). La longitud de cadena hidrocarbonada, el número de dobles enlaces y la posición de grupos metilo afecta a la fluidez de las membranas celulares. Así, se han observado diferencias en la composición de cadenas de ácidos grasos entre bacterias termófilas y mesófilas. En las bacterias termófilas, generalmente, los ácidos grasos presentan un mayor número de saturaciones y cadenas más largas que en bacterias mesófilas (Driessen y Albers, 2007).

En cuanto al ADN, se trata de una macromolécula estable a temperaturas relativamente elevadas (por debajo de 100°C) (Karni et al., 2013). Sin embargo, al aumentar la temperatura, el ADN se desnaturaliza resultando en la separación de sus dos hebras. Los microorganismos hipertermófilos poseen mecanismos para hacer frente a esta situación (Daniel y Cowan, 2000). Por ejemplo, Se ha observado *in vitro* que el ADN (y ARN) puede estabilizarse con distintas concentraciones de algunos iones como por ejemplo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Marguet y Forterre, 2001). Así, algunos hipertermófilos, como por ejemplo

*Methanothermus fervidus* o *Pyrococcus furiosus*, pueden alcanzar concentraciones citoplasmáticas de  $K^+$  de aproximadamente 1 M (Hensel y Konig, 1988) mientras que microorganismos mesófilos relacionados como *Methanobacterium bryantii* no superan la concentración de 0,5 M. Además, también se han descrito proteínas que interaccionan con el ADN y presentan un papel estabilizador o de reparación de daños del ADN. Las primeras serían proteínas con un papel similar a las histonas presentes típicamente en el dominio Eucarya. Las segundas incluirían enzimas con funciones diversas entre las que se encuentran glicosilasas, metiltransferasas, endonucleasas, exonucleasas, ligasas y polimerasas. Mención especial merece la enzima girasa inversa, típica de microorganismos hipertermófilos, que produciría enrollamientos positivos en la molécula de ADN lo que proporcionaría una mayor termoestabilidad (Forterre, 2002; Grosjean y Oshima, 2007).

### **1.9.2. Biomoléculas de bajo peso molecular**

Aparte de las grandes macromoléculas existen otras biomoléculas, con un peso molecular más bajo, que son esenciales para el metabolismo celular. Muchas de estas biomoléculas son inestables a altas temperaturas. Ejemplos son: piridozal fosfato, NADH, NADPH, ATP, FMN o Acetil fosfato (Daniel y Cowan, 2000). Por ejemplo, el 50% del NADH se degrada en 2.5 horas a 75°C, pH 6.3 y una fuerza iónica de 0,01 M (Walsh et al., 1983). Otros datos indicarían que el NADH se degrada a menos de un 5% del porcentaje inicial después de 1 hora a 95°C; el ATP se degrada a un 40% del porcentaje inicial después de 1 hora a 95°C (Daniel y Cowan, 2000).

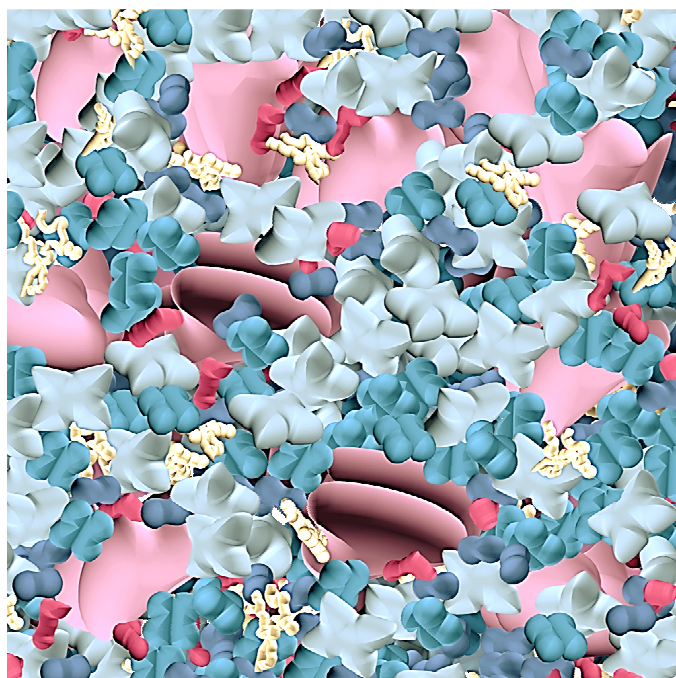
La posibilidad de utilizar estas moléculas podría determinar la temperatura máxima de crecimiento de un determinado organismo. Sin embargo, los estudios al respecto aún son escasos (Cowan, 2004; Bains et al., 2015).

## **1.10. Citoplasma y viscosidad celular**

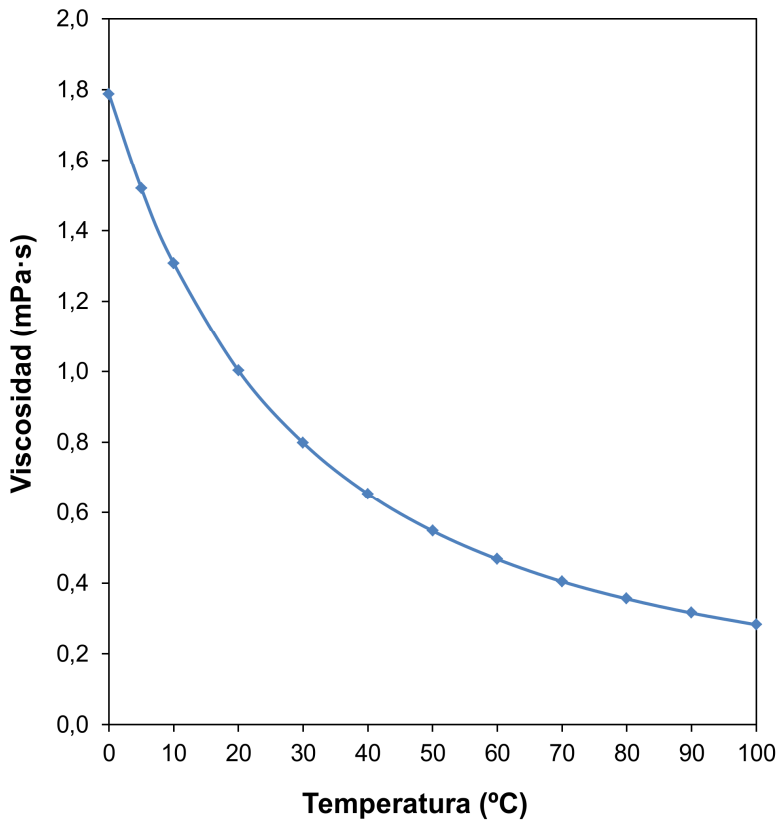
La concentración total de moléculas (agua, iones, metabolitos y macromoléculas) dentro de la célula se asume que es elevada (Luby-Phelps, 2000). Ello implicaría una visión radicalmente distinta de la distribución y comportamiento de las moléculas en las células frente a los ensayos que normalmente se realizan en el laboratorio, con soluciones relativamente diluidas y un escaso número de moléculas. En la actualidad, se considera que el citoplasma está constituido por una alta concentración de biomoléculas de tipos muy variados. A esta visión de la constitución del citoplasma se le conoce como “molecular crowding” (Goodsell, 1993) (Figura 1.9). Según este modelo, la consistencia del citoplasma sería más parecida a un gel viscoso que a una solución acuosa diluida, lo que tendría consecuencias en las propiedades físico-químicas de las moléculas que constituyen el citoplasma (Luby-Phelps, 2000; Pollack, 2001).

En una solución viscosa, la capacidad de movimiento de las macromoléculas se ve reducida por lo que su estructura es generalmente más estable (Finkelstein et al., 2007). La viscosidad está fuertemente influenciada por la temperatura, de manera que, al aumentar la temperatura, la viscosidad disminuye (Fogel'son y Likhachev, 2001) (Figura 1.10). Esta disminución de la viscosidad fruto de un aumento de temperatura puede repercutir negativamente en la estabilidad de ciertas biomoléculas. La vida a altas temperaturas tendría que ser capaz de adaptarse a posibles variaciones de viscosidad celular como resultado del aumento de la temperatura.

La viscosidad puede influir en la difusión de metabolitos y en la interacción entre biomoléculas (Demchenko et al., 1989; Klimov y Thirumalai 1997). La viscosidad del citoplasma también puede influir en procesos más generales, por



**Figura 1.9.** Representación gráfica simulando la sección transversal del citoplasma bacteriano que refleja el modelo de “molecular crowding” en el que existe una elevada concentración de biomoléculas.



**Figura 1.10.** Efecto de la temperatura sobre la viscosidad del agua (Dortmund Data Bank, 2005).

ejemplo, se han relacionado cambios de la viscosidad citoplasmática con el estado de latencia y germinación de las esporas de algunos hongos (Dijksterhuis et al., 2007). En algunas plantas durante la formación de semillas, aumentos de viscosidad afectan la regulación de algunos procesos metabólicos (Sun, 2000).

Hasta la fecha, los estudios encaminados a determinar la viscosidad del citoplasma solo se han realizado en eucariotas. Tras estudios puntuales en amebas y huevos de anélidos, realizados a principios del siglo XX, se iniciaron las primeras determinaciones de la viscosidad intracelular en cultivos celulares (Schaap y Forer, 1979; Pollack, 2001; Puchkov, 2013). Luby-phelps (1993) desarrolló un sistema eficaz para medir la viscosidad del interior celular utilizando moléculas fluorescentes y obtuvo valores ligeramente superiores a los del agua. En los últimos años este método se ha perfeccionado aunque la viscosidad intracelular de los microorganismos procariotas aún se desconoce.



## 1.11. Objetivos

Los objetivos de esta tesis son:

- Determinar la distribución de los microorganismos en función de la temperatura en un sistema natural, la fuente termal de Mae Fang (Tailandia), a lo largo de un gradiente de 50°C.
- Caracterizar un nuevo termófilo extremo aislado de la fuente termal Mae Fang (Tailandia).
- Evaluar la utilidad de las secuencias de genes que codifican por transposasas como modelo para determinar fenómenos de HGT aplicado al ejemplo del género *Fervidobacterium*.
- Evaluar la influencia de la viscosidad celular en la estabilización de biomoléculas lábiles (como por ejemplo NADH) a altas temperaturas.

## 1. 12. Bibliografía

- Abed, R. M., Dobretsov, S., Sudesh, K. (2009) Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1-12.
- Abel, K., Peterson, J. I. (1963) Classification of microorganisms by analysis of chemical composition I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* 85: 1039-1044.
- Allewalt, J. P., Bateson, M. M., Revsbech, N. P., Slack, K., Ward, D. M. (2006) Effect of temperature and light on growth of and photosynthesis by *Synechococcus* isolates typical of those predominating in the octopus spring microbial mat community of Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 544-550.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., Bentabet, A. E. O., López-García, P. (2014) Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles* 18: 1035-1047.
- Arezi, B., Xing, W., Sorge, J. A., Hogrefe, H. H. (2003) Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Anal. Biochem.* 321: 226-235.
- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., Weightman, A. J. (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7724-7736.
- Baas-Becking, L. G. M. (1934) *Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde*. Van Stockum & Zoon, The Hague.

- Bains, W., Xiao, Y., Yu, C. (2015) Prediction of the maximum temperature for life based on the stability of metabolites to decomposition in water. *Life (Basel)* 5: 1054-1100.
- Bansal, M. S., Banay, G., Harlow, T. J., Gogarten, J. P., Shamir, R. (2013) Systematic inference of highways of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Bioinformatics* 29: 571-579.
- Becq, J., Churlaud, C., Deschavanne, P. (2010) A benchmark of parametric methods for horizontal transfers detection. *PLoS One* 5: e9989.
- Beiko, R. G., Harlow, T. J., Ragan, M. A. (2005) Highways of gene sharing in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 14332-14337.
- Bhattacharya, P., Barnebey, A., Zemla, M., Goodwin, L., Auer, M., Yannone, S. M. (2015) Complete genome sequence of the chromate-reducing bacterium *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* strain BSB-33. *Stand. Genomic Sci.* 10: 1.
- Bhowmick, D. C., Bal, B., Chatterjee, N. S., Ghosh, A. N., Pal, S. (2009) A low-GC Gram-positive *Thermoanaerobacter*-like bacterium isolated from an Indian hot spring contains Cr (VI) reduction activity both in the membrane and cytoplasm. *J. Appl. Microbiol.* 106: 2006-2016.
- Biswas, M., Majumdar, S., Chowdhury, T., Chattopadhyay, B., Mandal, S., Halder, U., Yamasaki, S. (2010) Bioremediase a unique protein from a novel bacterium BKH1, ushering a new hope in concrete technology. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 581-587.
- Boomer, S. M., Pierson, B. K., Austinhirst, R., Castenholz, R. W. (2000) Characterization of novel bacteriochlorophyll-a-containing red filaments from alkaline hot springs in Yellowstone National Park. *Arch. Microbiol.* 174: 152-161.
- Borges, N., Matsumi, R., Imanaka, T., Atomi, H., Santos, H. (2010) *Thermococcus kodakarensis* mutants deficient in di-myo-inositol phosphate use aspartate to cope with heat stress. *J. Bacteriol.* 192: 191-197.

- Bose, S., Mukherjee, T., Sen, U., Roy, C., Rameez, M. J., Ghosh, W., Mukhopadhyay, S. K. (2016) Genome sequence of the multiple-protease-producing strain *Geobacillus thermoleovorans* N7, a thermophilic bacterium isolated from Paniphala Hot Spring, West Bengal, India. *Genome Announc.* 4: e01202-16.
- Boussau, B., Guéguen, L., Gouy, M. (2008) Accounting for horizontal gene transfers explains conflicting hypotheses regarding the position of aquificales in the phylogeny of Bacteria. *BMC Evol. Biol.* 8: 272.
- Brock, T. D. (1967) Life at high temperatures. Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. *Science* 158: 1012-1019.
- Brock, T. D., Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen. nov. and sp. nov., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98: 289-297.
- Burgess, E. A., Wagner, I. D., Wiegel, J. (2007) Thermal environments and biodiversity. In: Gerday, C., Glansdorff, N. (eds.) *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Pres, Washington.
- Calderón, M. I., Vargas, C., Rojo, F., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Ventosa, A., Nieto, J. J. (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043T. *Microbiology* 150: 3051-3063.
- Caro-Quintero, A., Konstantinidis, K. T. (2015) Inter-phylum HGT has shaped the metabolism of many mesophilic and anaerobic bacteria. *ISME J.* 9: 958-967.
- Cases, I., de Lorenzo, V. (2002) The grammar of (micro)biological diversity. *Environ. Microbiol.* 4: 623-627.
- Chaudhuri, B., Alam, N., Sarkar, M., Chowdhury, T., Chattopadhyay, B. (2016) Phylogenetic Characterization of BKH3 Bacterium Isolated from a Hot Spring Consortium of Bakreshwar (India) and Its Application. *Adv. Microbiol.* 6: 453-461.

- Chen, C., Lin, L., Peng, Q., Ben, K., Zhou, Z. (2002) *Meiothermus rosaceus* sp. nov. isolated from Tengchong hot spring in Yunnan, China. *FEMS Microbiol. Lett.* 216: 263-268.
- Chen, J. J., Lin, L. B., Zhang, L. L., Zhang, J., Tang, S. K., Wei, Y. L., Li, W. J. (2012) *Laceyella sediminis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 38-42.
- Chen, Y., He, Y., Zhang, B., Yang, J., Li, W., Dong, Z., Hu, S. (2011) Complete genome sequence of *Alicyclobacillus acidocaldarius* strain Tc-4-1. *J. Bacteriol.* 193: 5602-5603.
- Cheng-Ying, C. Z. W. J., Shuang-Jiang, L. I. U. (2004) Survey on and Phytogeny of *Alicyclobacillus* Species in Hot Springs of Southern China's Guangdong and Yunna Provinces. *Microbiology* 3: 013.
- Clarke, A. (2014) The thermal limits to life on Earth. *Int. J. Astrobiology* 13: 141-154.
- Cowan, D. A. (2004) The upper temperature for life—where do we draw the line?. *Trends Microbiol.* 12: 58-60.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10494-10499.
- Da Costa, M. S., Santos, H., Galinski, E. A. (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61: 117-153.
- Daniel, R. M., Cowan, D. A. (2000) Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 250.
- Darmon, E., Leach, D. R. (2014) Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78: 1-39.
- Demchenko, A. P., Rusyn, O. I., Saburova, E. A. (1989) Kinetics of the lactate dehydrogenase reaction in high-viscosity media. *Biochim. Biophys. Acta* 998: 196-203.

- Dijksterhuis, J., Nijse, J., Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. (2007) High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. *Euk. Cell* 6: 157-170.
- Ding, B., Li, Q., Ji, X., Liao, Y., Wei, Y., Lin, L. (2010) Study on a thermophilic *Bacillus pumilus* sp. and its thermostable  $\alpha$ -amylase. *Sci. Technol. Food Ind.* 31: 185-190.
- Ding, J. N., He, H., Zhang, C. G., Yu, Y. Z., Qiu, G. Z. (2008) Isolation and characterization of YNTC-1, a novel *Alicyclobacillus sendaiensis* strain. *J. Cent. South Univ. T.* 15: 508-514.
- Ding, J. N., Jian, G. A. O., Wu, X. L., Zhang, C. G., Wang, D. Z., Qiu, G. Z. (2007) Jarosite-type precipitates mediated by YN22, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, and their influences on strain. *T. Nonferr. Metal Soc.* 17: 1038-1044.
- Ding, J., Zhang, R., Yu, Y., Jin, D., Liang, C., Yi, Y., Zhu, W., Xia, J. (2011) A novel acidophilic, thermophilic iron and sulfur-oxidizing archaeon isolated from a hot spring of tengchong, Yunnan, China. *Braz. J. Microbiol.* 42: 514-525.
- Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., Fewer, D. P. (2015) Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 23: 642-652.
- Dong, L., Ming, H., Liu, L., Zhou, E. M., Yin, Y. R., Duan, Y. Y., Nie, G. X., Feng, H. G., Li, W. J. (2014a) *Zhizhongheella caldifontis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Comamonadaceae. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 105: 755-761.
- Dong, L., Ming, H., Yin, Y. R., Duan, Y. Y., Zhou, E. M., Nie, G. X., Feng, H. G., Li, W. J. (2014b) *Roseomonas alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkali geothermal soil sample in Tengchong, Yunnan, south-west China. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 105: 899-905.

- Dong, L., Ming, H., Zhou, E. M., Yin, Y. R., Liu, L., Feng, H. G., Xian, W. D., Nie, G. X., Li, W. J. (2015) *Crenobacter luteus* gen. nov., sp. nov., isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 214-219.
- Doolittle, W. F. (2000) Uprooting the tree of life. *Sci. Am.* 282: 90-95.
- Dortmund Data Bank (2005), DDBST GmbH, Oldenburg, Germany. [Available at <http://www.ddbst.de>]
- Driessen, A. J., Albers, S. V. (2007) Membrane adaptations of (hyper) thermophiles to high temperatures. In: Gerday, C., Glansdorff, N. (eds.) *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Pres, Washington.
- Duan, Y. Y., Ming, H., Dong, L., Yin, Y. R., Meng, X. L., Zhou, E. M., Zhang, J. X., Nie, G. X., Li, W. J. (2015) *Cecembia rubra* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 2118-123.
- Duan, Y. Y., Ming, H., Dong, L., Yin, Y. R., Zhang, Y., Zhou, E. M., Liu, L., Nie, G. X., Li, W. J. (2014) *Streptomyces calidiresistens* sp. nov., isolated from a hot spring sediment. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 106: 189-196.
- Dufraigne, C., Fertil, B., Lespinats, S., Giron, A., Deschavanne, P. (2005) Detection and characterization of horizontal transfers in prokaryotes using genomic signature. *Nucl. Acids Res.* 33: e6-e6.
- Edwards, T. A., Calica, N. A., Huang, D. A., Manoharan, N., Hou, W., Huang, L., Panosyan, H., Dong, H., Hedlund, B. P. (2013) Cultivation and characterization of thermophilic *Nitrospira* species from geothermal springs in the US Great Basin, China, and Armenia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85: 283-292.
- Empadinhas, N., da Costa, M. S. (2011) Diversity, biological roles and biosynthetic pathways for sugar-glycerate containing compatible solutes in bacteria and archaea. *Environ. Microbiol.* 13: 2056-2077.
- Fardeau, M. L., Bonilla Salinas, M., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Verhé, F., Cayol, J. L., Patel, B. K., Garcia, J. L., Ollivier, B. (2004) Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to

- Thermoanaerobacter subterraneus: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 467-74.
- Faria, T. Q., Mingote, A., Siopa, F., Ventura, R., Maycock, C., Santos, H. (2008) Design of new enzyme stabilizers inspired by glycosides of hyperthermophilic microorganisms. *Carbohydr. Res.* 343: 3025-3033.
- Finkelstein, I. J., Massari, A. M., Fayer, M. D. (2007) Viscosity-Dependent Protein Dynamics. *Biophys. J.* 92: 3652-3662.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C. A., Gocayne, J. D., Scott, J. D., Shirley, R., Liu, L. I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O., Venter, J. C. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
- Fogel'son, R. L., Likhachev, E. R. (2001) Temperature dependence of viscosity. *Tech. Phys.* 46: 1056-1059.
- Forterre, P. (2002) A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends Genet.* 18: 236-237.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 722-732.
- Garrity, G.M., Holt, J. G., Castenholz, R. W., Pierson, B. K., Keppen, O. I., Gorlenko, V. M. (2001) Phylum BVI. Chloroflexi phy. nov. In: Boone, D.



- R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York.
- Ghati, A., Sarkar, K., Paul, G. (2013) Isolation, characterization and molecular identification of esterolytic thermophilic bacteria from an Indian hot spring. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 1: 196-02.
- Ghelani, A., Patel, R., Mangrola, A., Dudhagara, P. (2015) Cultivation-independent comprehensive survey of bacterial diversity in Tulsi Shyam Hot Springs, India. *Genom. Data* 4: 54-56.
- Gonzalez, J. M., Ortiz-Martinez, A., Gonzalez-delValle, M. A., Laiz, L., Sáiz-Jiménez, C. (2003) An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *J. Microbiol. Methods* 55: 459-463.
- Gonzalez, J. M., Portillo, M. C., Belda-Ferre, P., Mira, A. (2012) Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One* 7: e29973.
- Gonzalez, J. M., Robb, F. T. (2000) Genetic analysis of the carbon monoxide dehydrogenase, *cooF* and *cooS*, genes from the bacterium *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 243-247.
- Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2004) Microbial diversity in biodeteriorated monuments as studied by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Sep. Sci.* 27: 174-180.
- Gonzalez, J.M., Zimmermann, J., Saiz-Jimenez, C. (2005) Evaluating putative chimeric sequences from PCR amplified products and other cross-over events. *Bioinformatics* 21: 333-337.
- Goodfellow, M., Minnikin, D. (1985) *Chemical methods in bacterial systematics* (1st ed.) Academic Press, London.
- Goodsell, D. S. (1993) *The machinery of life*. Springer-Verlay, New York.

- Goodwin, S., McPherson, J. D., McCombie, W. R. (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17: 333-351.
- Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (Lond.)* 27: 113-159.
- Grosjean H., Oshima, T., (2007) How Nucleic Acids Cope with High Temperature. In: Gerday, C., Glansdorff, N. (eds) *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. ASM Press, Washington.
- Hall, J. R., Mitchell, K. R., Jackson-Weaver, O., Kooser, A. S., Cron, B. R., Crossey, L. J., Takacs-Vesbach, C. D. (2008) Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4910-4922.
- Hall, N. (2007) Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J. Exp. Biol.* 210: 1518-1525.
- Han, B. Chen, X. Dai, W. Hong, X. Ji, Y. Wei, L. Lin (2010) Diversity of thermoacidophilic *Sulfolobus* in hot springs in Tengchong of Yunnan, China. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* 16: 692-696.
- Häring, M., Rachel, R., Peng, X., Garrett, R. A., Prangishvili, D. (2005) Viral diversity in hot springs of Pozzuoli, Italy, and characterization of a unique archaeal virus, *Acidianus* bottle-shaped virus, from a new family, the Ampullaviridae. *J. Virol.* 79: 9904-9911.
- He, Z. G., Zhong, H., Li, Y. (2004) *Acidianus tengchongensis* sp. nov., a new species of acidothermophilic archaeon isolated from an acidothermal spring. *Curr. Microbiol.* 48: 159-163.
- Hedlund, B. P., Cole, J. K., Williams, A. J., Hou, W., Zhou, E., Li, W., Dong, H. (2012) A review of the microbiology of the Rehai geothermal field in Tengchong, Yunnan Province, China. *Geosci. Front.* 3: 273-288.
- Hensel, R., König, H. (1988) Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 75-79.

- Hilario, E., Gogarten, J. P. (1993) Horizontal transfer of ATPase genes—the tree of life becomes a net of life. *Biosystems* 31: 111-119.
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., Moffett, B. F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 1-11.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., Kudo, T. (2003) Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 299-304.
- Hooper, S. D., Mavromatis, K., Kyrpides, N. C. (2009) Microbial co-habitation and lateral gene transfer: what transposases can tell us. *Genome Biol.* 10: R45.
- Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., Bohannon, B. J. (2004) A taxa–area relationship for bacteria. *Nature* 432: 750-753.
- Hou, W., Wang, S., Dong, H., Jiang, H., Briggs, B. R., Peacock, J. P., Huang, Q., Huang, L., Wu, G., Zhi, X., Li, W., Dodsworth, J.A., Hedlund, B.P., Zhang, C., Hartnett, H.E., Dijkstra, P., Hungate, B.A. (2013) A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing. *PLoS One* 8: e53350.
- Huan, H. E., Yi, Y. A. N. G., Xia, J. L., Ding, J. N., Zhao, X. J., Nie, Z. Y. (2008) Growth and surface properties of new thermoacidophilic Archaea strain *Acidianus manzaensis* YN-25 grown on different substrates. *T. Nonferr. Metal. Soc.* 18: 1374-1378.
- Hubert, C., Loy, A., Nickel, M., Arnosti, C., Baranyi, C., Brüchert, V., Ferdelman, T., Finster, K., Christensen, F.M., Rosa de Rezende, J., Vandieken, V., Vandieken, V. (2009) A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold Arctic seabed. *Science* 325: 1541-1544.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.

- Hugenholtz, P., Stackebrandt, E. (2004) Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass Sphaerobacteridae in the phylum Actinobacteria to the class Thermomicrobia (emended description) in the phylum Chloroflexi (emended description). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2049-2051.
- Itoh, T., Iino, T. (2013) Phylogeny and biological features of thermophiles. In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y. (eds.) *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer, Dordrecht.
- Jessup, C. M., Kassen, R., Forde, S. E., Kerr, B., Buckling, A., Rainey, P. B., Bohannan, B. J. (2004) Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends Ecol. Evol.* 19: 189-197.
- Jing, C. B. W. Y. L., Lu, S. R. J. X. L., Lian-Bing, Y. Q. L. (2008) Identification of a *Thermoacidophilic Sulfolobus* sp. Isolated from a Hot Spring in Tengchong Rehai [J]. *Microbiology* 12: 005.
- Kanasawud, P., Teeyapan, S., Lumyong, S., Holst, O., Mattiasson, B. (1992) *Thermus* 2S from Thai hot springs: isolation and immobilization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 137-140.
- Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K., Eurwilaichitr, L. (2004) Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. *J. Basic Microbiol.* 44: 430-444.
- Kanoksilapatham, W., Keawram, P., Gonzalez, J. M., Robb, F. T. (2015) Isolation, characterization, and survival strategies of *Thermotoga* sp. strain PD524, a hyperthermophile from a hot spring in Northern Thailand. *Extremophiles* 19: 853-861.
- Kanoksilapatham, W., Pasomsup, P., Portillo, M. C., Keawram, P., Gonzalez, J. M. (2012) Identification and Characterization of a Freshwater *Pyrococcus* sp. Strain PK 5017 and Identification of Pfu-Like IS Elements in *Thermococcus sibiricus* MM 739. *Int. J. Biol.* 4: 11.

- Karni, M., Zidon, D., Polak, P., Zalevsky, Z., Shefi, O. (2013) Thermal degradation of DNA. *DNA Cell Biol.* 32: 298-301.
- Kearey, P., Klepeis, K. A., Vine, F. J. (2009) *Global tectonics*. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Keawram, P., Pongsapukdee, V., Kanoksilapatham, W. (2016) Isolation of *Thermotoga* spp. and *Fervidobacterium* spp., and Characterization of 16S rRNA Genes of Order Thermotogales: Unique Lineage of Hyperthermophiles Thriving in 3 Hot Springs in Thailand. *Silpakorn U. Sci. Technol. J.* 10: 9-20.
- Kemp, P. F., Aller, J. Y. (2004) Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 161-177.
- Klimov, D. K., Thirumalai, D. (1997) Viscosity dependence of the folding rates of proteins. *Phys. Rev. Lett.* 79: 317.
- Koga, Y. (2012) Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea*. 2012: Article ID 789652, 6 pages.
- Konstantinidis, K. T., Tiedje, J. M. (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 2567-2572.
- Koonin, E. V., Galperin M. Y. (1997) Prokaryotic genomes: the emerging paradigm of genome-based microbiology. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 757-63.
- Kumar, S., Singh, S. K., Gromiha, M. M. (2010) Temperature-Dependent Molecular Adaptations, Microbial Proteins. In: Gröger, H., Borchert, S., Krauß, M., Hummel, W. (eds.) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Kurtzman, C. P. (1992) rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42: 1-6.

- Lau, M. C., Aitchison, J. C., Pointing, S. B. (2009) Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles* 13: 139-149.
- Lawrence, J. G., Ochman, H. (1997) Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J. Mol. Evol.* 44: 383-397.
- Lawrence, J. G., Ochman, H. (2002) Reconciling the many faces of lateral gene transfer. *Trends. Microbiol.* 10: 1-4.
- Li, W., Liao, C., Liu, S., Wang, J., Zhou, J. (2004) Xylanase from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain YNUCCTCRQ1 and its phylogenetic analysis. *Chem. Ind. For. Prod.* 24: 41-44.
- Lin, L., Chen, C., Peng, Q., Ben, K., Zhou, Z. (2002) *Thermus rehai* sp. nov., isolated from Rehai of Tengchong, Yunnan Province, China. *J. Basic Microbiol.* 42: 337-344.
- Lin, L., Zhang, J., Wei, Y., Chen, C., Peng, Q. (2005) Phylogenetic analysis of several *Thermus* strains from Rehai of Tengchong, Yunnan, China. *Can. J. Microbiol.* 51: 881-886.
- Little, A. E., Robinson, C. J., Peterson, S. B., Raffa, K. F., Handelsman, J. (2008) Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 375-401.
- Liu, L. J., You, X. Y., Guo, X., Liu, S. J., Jiang, C. Y. (2011) *Metallosphaera cuprina* sp. nov., an acidothermophilic, metal-mobilizing archaeon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2395-2400.
- Livo, K. E., Kruse, F. A., Clark, R. N., Kokaly, R. F., Shanks III, W. C. (2007) Hydrothermally altered rock and hot-spring deposits at Yellowstone National Park—characterized using airborne visible-and infrared-spectroscopy data. In: Morgan, L. A. (ed.) *Integrated Geoscience Studies in the Greater Yellowstone Area—Volcanic, Tectonic, and Hydrothermal Processes in the Yellowstone Geocosystem*; US Geological Survey; Reno, N. V., U.S.A..

- Lu, Y., Chen, B., Liu, X., Ji, X., Wei, Y., Lin, L. (2009) Isolation and identification of seven thermophilic and anaerobic bacteria from hot springs in Tengchong Rehai. *Acta Microbiol. Sin.* 49: 1234-1239.
- Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* 192: 189-221.
- Luby-Phelps, K., Mujumdar, S. W. A. T. I., Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Galbraith, W., Waggoner, A. S. (1993) A novel fluorescence ratiometric method confirms the low solvent viscosity of the cytoplasm. *Biophys. J.* 65: 236-242.
- Mangrola, A., Dudhagara, P., Koringa, P., Joshi, C. G., Parmar, M., Patel, R. (2015) Deciphering the microbiota of Tuwa hot spring, India using shotgun metagenomic sequencing approach. *Genom. Data* 4: 153-155.
- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002) The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environ. Microbiol.* 4: 595-602.
- Mardanov, A. V., Gumerov, V. M., Beletsky, A. V., Perevalova, A. A., Karpov, G. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Ravin, N. V. (2011) Uncultured archaea dominate in the thermal groundwater of Uzon Caldera, Kamchatka. *Extremophiles* 15: 365-372.
- Marguet, E., Forterre, P. (2001) Stability and manipulation of DNA at extreme temperatures. *Meth. Enzymol.* 334: 205-215.
- Marsh, C.L. Larsen, D.H. (1953) Characterization of some thermophilic bacteria from the hot springs of Yellowstone National Park. *J. Bacteriol.* 65: 193-197.
- Martiny, J. B. H., Bohannon, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreås, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., Staley, J.T. (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 102-112.

- Mehta, D., Satyanarayana, T. (2013) Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y (eds.) *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology*. Springer, Dordrecht.
- Meyer-Dombard, D. R., Shock, E. L., Amend, J. P. (2005) Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, U.S.A.. *Geobiology*, 3: 211-227.
- Miller, S. R., Strong, A. L., Jones, K. L., Ungerer, M. C. (2009) Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4565-4572.
- Ming, H., Duan, Y. Y., Guo, Q. Q., Yin, Y. R., Zhou, E. M., Liu, L., Li, S., Nie, G. X., Li, W. J. (2015) *Meiothermus roseus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a geothermal area. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 108: 897-905.
- Ming, H., Duan, Y. Y., Yin, Y. R., Meng, X. L., Li, S., Zhou, E. M., Huang, J. R., Nie, G. X., Li, W. J. (2016) *Crenalkalicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., thermophilic bacterium isolated from alkaline hot springs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2319-26.
- Ming, H., Yin, Y. R., Li, S., Nie, G. X., Yu, T. T., Zhou, E. M., Liu, L., Dong, L., Li, W. J. (2014) *Thermus caliditerrae* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a geothermal area. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 650-656.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 73: 127-141.



- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O. y Venter, J. C., Fraser, C. M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399: 323-329.
- Nesbø, C.L., Baptiste, E., Curtis, B., Dahle, H., Lopez, P., Macleod, D., Dlutek, M., Bowman, S., Zhaxybayeva, O., Birkeland, N.K., Doolittle, W.F. (2009) The genome of *Thermosiphon africanus* TCF52B: lateral genetic connections to the Firmicutes and Archaea. *J. Bacteriol.* 191: 1974-1978.
- Pace, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Pakpitcharoen, A., Potivejkul, K., Kanjanavas, P., Areekit, S., Chansiri, K. (2008) Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. *Sci. Asia* 34: 424-431.
- Palleroni, N.J. (1997) Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 72: 3-19.
- Panda, M. K., Sahu, M. K., Tayung, K. (2013) Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iran. J. Microbiol.* 5: 159.
- Pedrós-Alió, C. (2006) Marine microbial diversity: can it be determined?. *Trends Microbiol.* 14: 257-263.
- Pedros-Alio, C. (2010) Genomics and marine microbial ecology. *Int. Microbiol.* 9: 191-197.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., Tang, J. (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.* 33: 183-209.
- Pollack, G. H. (2001) *Cells, gels and the engines of life: a new, unifying approach to cell function*. Ebner & Sons, Seattle, Washington.

- Portillo, M. C., Gonzalez, J. M. (2008) Statistical differences between relative quantitative molecular fingerprints from microbial communities. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 94: 157-163.
- Portillo, M. C., Gonzalez, J. M. (2009) CRISPR elements in the Thermococcales: evidence for associated horizontal gene transfer in *Pyrococcus furiosus*. *J. Appl. Genet.* 50: 421-430.
- Portillo, M. C., Santana, M., Gonzalez, J. M. (2012) Presence and potential role of thermophilic bacteria in temperate terrestrial environments. *Naturwissenschaften* 99: 43-53.
- Portillo, M. C., Sririn, V., Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J.M. (2009a) Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles* 13: 321-331.
- Portillo, M. C., Sririn, V., Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J. M. (2009b) Pigment profiles and bacterial communities from Thailand thermal mats. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 96: 559-567.
- Priest, F., Austin, B. (1993) *Modern bacterial taxonomy*. Chapman & Hall, Ltd., London.
- Prosser, J. I., Bohannon, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J.L., Green, L.E., Killham, K., Lennon, J.J., Osborn, A.M., Solan, M., van der Gast, C.J., Young, J.P. (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 384-392.
- Puchkov, E. O. (2013) Intracellular viscosity: Methods of measurement and role in metabolism. *Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 7: 270.
- Purcell, D., Sompong, U., Yim, L. C., Barraclough, T. G., Peerapornpisal, Y., Pointing, S. B. (2007) The effects of temperature, pH and sulphide on the community structure of hyperthermophilic streamers in hot springs of northern Thailand. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60: 456-466.
- Rakshak, K., Ravinder, K., Srinivas, T. N. R., Kumar, P. A. (2013) *Caldimonas meghalayensis* sp. nov., a novel thermophilic betaproteobacterium isolated

- from a hot spring of Meghalaya in northeast India. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 104: 1217-1225.
- Rappé, M. S., Giovannoni, S. J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.
- Ravenhall, M., Škunca, N., Lassalle, F., Dessimoz, C. (2015) Inferring horizontal gene transfer. *PLoS Comput. Biol.* 11: e1004095.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 19126-19131.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39-67.
- Sant'Anna, F. H., Lebedinsky, A. V., Sokolova, T. G., Robb, F. T., Gonzalez, J. M. (2015) Analysis of three genomes within the thermophilic bacterial species *Caldanaerobacter subterraneus* with a focus on carbon monoxide dehydrogenase evolution and hydrolase diversity. *BMC genomics* 16: 757.
- Santos, H., Da Costa, M. S. (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.* 4: 501-509.
- Sarkar, M., Alam, N., Chaudhuri, B., Chattopadhyay, B. D., Mandal, S. (2015) Development of an improved *E. coli* bacterial strain for green and sustainable concrete technology. *RSC Adv.* 5: 32175.
- Schaap, C. J., Forer, A. (1979) Temperature effects on anaphase chromosome movement in the spermatocytes of two species of crane flies (*Nephrotoma suturalis* Loew and *Nephrotoma ferruginea* Fabricius) *J. Cell Sci.* 39: 29-52.
- Schwartzman, D. W., Lineweaver, C. H. (2004) The hyperthermophilic origin of life revisited. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 168-171.
- Shaw, N. (1974) Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 17: 63-108.
- Siguier, P., Gourbeyre, E., Chandler, M. (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38: 865-891.

- Singh, A., Subudhi, E. (2016) Structural insights of microbial community of Deulajhari (India) hot spring using 16s-rRNA based metagenomic sequencing. *Genom. Data* 7: 101-102.
- Sompong, U., Anuntalabhochai, S., Cutler, R. W., Castenholz, R. W., Peerapornpisal, Y. (2008) Morphological and phylogenic diversity of cyanobacterial populations in six hot springs of Thailand. *Sci. Asia* 34: 153-162.
- Sompong, U., Hawkins, P. R., Besley, C., Peerapornpisal, Y. (2005) The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 365-376.
- Subtavewung, P. H., Raksaskulwong, M., Tulyatid, J. (2005) The characteristic and classification of hot springs in Thailand. *Proceedings World Geothermal Congress, Antalya, Turkey*: 1-7.
- Sun, W. Q. (2000) Dielectric relaxation of water and water-plasticized biomolecules in relation to cellular water organization, cytoplasmic viscosity, and desiccation tolerance in recalcitrant seed tissues. *Plant Physiol.* 124: 1203-1215.
- Suzuki, K., Goodfellow, M., O'Donnell, A. G. (1993) Cell envelopes and classification. In: Goodfellow, M., O'Donnell, A. G. (eds.) *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press Ltd., London.
- Syvanen, M. (1985) Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution. *J. Theor. Biol.* 112: 333-343.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Horikoshi, K. (2008) Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 10949-10954.
- Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K., Eurwilaichitr, L. (2008)

- Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *J. Biotechnol.* 133: 42-49.
- Urbieto, M. S., Donati, E. R., Chan, K. G., Shahar, S., Sin, L. L., Goh, K. M. (2015) Thermophiles in the genomic era: biodiversity, science, and applications. *Biotechnol. Adv.*, 33: 633-647.
- van Wolferen, M., Ajon, M., Driessen, A. J., Albers, S. V. (2013) How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions. *Extremophiles* 17: 545-563.
- Vandamme, P., Peeters, C. (2014) Time to revisit polyphasic taxonomy. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 106: 57-65.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 1-43.
- Vorgias, C. E., Antranikian, G. (2004) Extremophiles: pH, temperature, and salinity. In: Bull, A. T. (ed.) *Microbial Diversity and Bioprospecting*. ASM Press, Washington.
- Wagner, A. (2006) Periodic extinctions of transposable elements in bacterial lineages: evidence from intragenomic variation in multiple genomes. *Mol. Biol. Evol.* 23: 723-733.
- Walsh, K. A. J., Daniel, R. M., Morgan, H. W. (1983) A soluble NADH dehydrogenase (NADH: ferricyanide oxidoreductase) from *Thermus aquaticus* strain T351. *Biochem. J.* 209: 427-433.
- Waltham, T. (2001) A guide to the volcanoes of southern Kamchatka, Russia. *Proc. Geol. Assoc.* 112: 67-78.
- Wang, S., Hou, W., Dong, H., Jiang, H., Huang, L., Wu, G., Zhang, C., Song, Z., Zhang, Y., Ren, H., Zhang, J. (2013) Control of temperature on

- microbial community structure in hot springs of the Tibetan Plateau. *PLoS One* 8: e62901.
- Wang, X., Gao, R., Liao, C., Meng, Y., Tang, X., Li, J., Xu, B., Huang, Z. (2011) Isolation of *Geobacillus* sp. A27 and characterization of its  $\alpha$ -amylase. *Sci. Technol. Food Ind.* 32: 151-155.
- Ward, D. M. (2006) Microbial diversity in natural environments: focusing on fundamental questions. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 90: 309-324.
- Wemheuer, B., Taube, R., Akyol, P., Wemheuer, F., Daniel, R. (2013) Microbial Diversity and Biochemical Potential Encoded by Thermal Spring Metagenomes Derived from the Kamchatka Peninsula. *Archaea* 2013: ID 136714.
- West, S. A., Diggle, S. P., Buckling, A., Gardner, A., Griffin, A. S. (2007) The social lives of microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 53-77.
- Whitfield, J. (2005) Biogeography: is everything everywhere? *Science* 310: 960.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6578-6583.
- Whitton, B. A. (2012) *Ecology of cyanobacteria II*. Springer, Netherlands.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4576-4579.
- Woodward, G., Dybkjaer, J. B., Ólafsson, J. S., Gíslason, G. M., Hannesdóttir, E. R., Friberg, N. (2010) Sentinel systems on the razor's edge: effects of warming on Arctic geothermal stream ecosystems. *Glob. Chang. Biol.* 16: 1979-1991.
- Wu, J. Y., Jiang, X. T., Jiang, Y. X., Lu, S. Y., Zou, F., Zhou, H. W. (2010) Effects of polymerase, template dilution and cycle number on PCR based 16 S rRNA diversity analysis using the deep sequencing method. *BMC Microbiol.* 10: 255.

- Wu, X., Zhu, R., Ding, J., Wei, J., Li, Y., Qiu, G. (2008) Isolation, characterization of heterotrophic acidothermophile TC-2 and its influence on bioleaching of chalcopyrite. *Chinese J. Nonferr. Met.* 18: 2259-2264.
- Xiang, X., Dong, X., Huang, L. (2003) *Sulfolobus tengchongensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Tengchong, China. *Extremophiles* 7: 493-498.
- Xie, W., Zhang, C. L., Wang, J., Chen, Y., Zhu, Y., Torre, J. R., Dong, H., Hartnett H.E., Hedlund, B. P., Klotz, M. G. (2015) Distribution of ether lipids and composition of the archaeal community in terrestrial geothermal springs: impact of environmental variables. *Environ. Microbiol.* 17: 1600-1614.
- Xue, Y., Xu, Y., Liu, Y., Ma, Y., Zhou, P. (2001) *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1335-1341.
- Xue, Y., Zhang, X., Zhou, C., Zhao, Y., Cowan, D. A., Heaphy, S., Grant, W. D., Jones, B. E., Ventosa, A., Ma, Y., (2006) *Caldalkalibacillus thermarum* gen. nov., sp. nov., a novel alkalithermophilic bacterium from a hot spring in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1217-1221.
- Yadav, S. P. (2007) The wholeness in suffix-omics, -omes, and the word om. *J. Biomol. Tech.* 18: 277.
- Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., Chansiri, K. (2011) Characterization of Thermophilic Halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao Dam Hot Spring, Thailand. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 5294–5303.
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F. O. (2013) The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42: D643-648.
- Yu, T. T., Ming, H., Yao, J. C., Zhou, E. M., Park, D. J., Hozzein, W. N., Kim, C. J., Wadaan, M. A., Li, W. J. (2015) *Thermus amyloliquefaciens* sp. nov.,

- isolated from a hot spring sediment sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 2491-2495.
- Yunlin, L. Y. J. X. W., Lianbing, L. (2010) Study on A Thermophilic *Geobacillus* sp. GSEY01 and Its Thermophilic Protease. *Biotechnol. Bull.* 6: 039.
- Zhang, C. M., Huang, X. W., Pan, W. Z., Zhang, J., Wei, K. B., Klenk, H. P., Tang, S. K., Li, W. J., Zhang, K. Q (2011) *Anoxybacillus tengchongensis* sp. nov. and *Anoxybacillus eryuanensis* sp. nov., facultatively anaerobic, alkalitolerant bacteria from hot springs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 118-122.
- Zhang, F., Liu, X., Dong, X. (2012) *Thermosyntropho tengcongensis* sp. nov., a thermophilic bacterium that degrades long-chain fatty acids syntrophically. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 759-763.
- Zhang, X. Q., Ying, Y., Ye, Y., Xu, X. W., Zhu, X. F., Wu, M. (2010) *Thermus arciformis* sp. nov., a thermophilic species from a geothermal area. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 834-839.
- Zhang, X. Q., Zhang, Z. L., Wu, N., Zhu, X. F., Wu, M. (2013) *Anoxybacillus vitaminiphilus* sp. nov., a strictly aerobic and moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 4064-4071.
- Zhang, Y., Ju, J., Peng, H., Gao, F., Zhou, C., Zeng, Y, Xue, Li, Y., Henrissat, B., Gao, G. F., Ma, Y. (2008) Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A. *J. Biol. Chem.* 283: 31551-31558.
- Zhaxybayeva, O., Swithers, K.S., Lapierre, P., Fournier, G.P., Bickhart, D.M., DeBoy, R.T., Nelson, K.E., Nesbø, C.L., Doolittle, W.F., Gogarten, J.P., Noll, K.M. (2009) On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 5865-5870.



Zimmermann, J., Gonzalez, J. M., Sáiz-Jiménez, C., Ludwig, W. (2005)  
Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured  
acidobacterial communities in Altamira Cave using 23S rRNA sequence  
analyses. *Geomicrobiol. J.* 22: 379-388.



## *Capítulo 2*

# **Comunidades bacterianas en aguas termales.**

**Estudio a lo largo de un gradiente  
de temperatura de 50°C**

## 2.1. Resumen

Entender cómo se distribuyen las bacterias es uno de los retos más importantes de la ecología microbiana. Los distintos factores que influyen en su distribución aún no han sido descifrados. Una fuente termal del Norte de Tailandia que presentaba un gradiente de temperatura de 50°C ha sido el modelo de estudio. Este gradiente sirvió para determinar la estructura de las comunidades bacterianas en ese ambiente y para evaluar la influencia de la temperatura en su distribución. Las comunidades fueron analizadas mediante la amplificación del gen ARNr 16S, electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), clonación y secuenciación parcial de dicho gen. Las dos divisiones más abundantes, Cyanobacteria y Chloroflexi, mostraron distribuciones características a lo largo del gradiente de temperatura. Diferentes grupos se situaban en zonas específicas del gradiente. Comparaciones de las comunidades bacterianas mostraron un fuerte descenso en su similitud al aumentar la diferencia de temperatura. Se observaron picos de mayor diversidad a 50°C y 70°C. Este estudio contribuye a explicar cómo las condiciones ambientales y las interacciones microbianas pueden influir en la distribución de grupos bacterianos y divisiones específicas formando la estructura de las comunidades microbianas en la naturaleza.

## **2.2. Introducción**

A pesar del papel tan importante que desempeñan los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos de los distintos elementos (Whitman et al., 1998) y la alta diversidad microbiana existente (Curtis et al., 2002), nuestra comprensión sobre la distribución de microorganismos específicos en relación con factores ambientales es escasa (Curtis et al., 2002; Prosser et al., 2007). Entender la distribución de los microorganismos es importante para conocer su biogeografía y el papel que desempeñan en el medio ambiente (Martiny et al., 2006; Portillo et al., 2009b).

Se considera que los microorganismos son capaces de alcanzar y colonizar cualquier hábitat, incluso aquellos que se encuentran bajo condiciones extremas. Esto dio lugar a la hipótesis ‘everything is everywhere, but the environment selects’ (Baas-Becking, 1934) la cual ha suscitado tanto apoyo (Martiny et al., 2006) como oposición (Fenchel y Finlay, 2003; Whitfield, 2005). En la actualidad, se están llevando a cabo investigaciones para explicar la diversidad, distribución y los patrones biogeográficos de los microorganismos y si estos concuerdan con los patrones seguidos por organismos superiores (Fenchel y Finlay, 2003; Martiny et al., 2006; Prosser et al., 2007). Ha de tenerse en cuenta que en la naturaleza los microorganismos viven en diferentes condiciones ambientales e interactuando con otros microorganismos. Las interacciones ecológicas (por ejemplo, competencia, mutualismo) entre microorganismos son escasamente conocidas aunque la información actual sugiere que estos mecanismos pueden ser importantes para determinar la estructura de las comunidades microbianas (Prosser, 2012).

Los ambientes de altas temperaturas, como por ejemplo las fuentes termales, están habitados exclusivamente por microorganismos y constituyen ambientes

fuertemente excluyentes para microorganismos alóctonos. Además, estos ambientes muestran amplios gradientes de temperatura en áreas reducidas permitiendo el estudio de la influencia de la temperatura en las comunidades microbianas, mientras otros factores se mantienen constantes (Miller et al., 2009). Las fuentes termales representan interesantes modelos de ecosistemas microbianos que ofrecen excelentes oportunidades para investigar cuestiones fundamentales de la estructura de las comunidades y la distribución de los microorganismos (Jessup et al., 2004).

La presencia de tapetes microbianos es frecuente en fuentes termales. Por ejemplo, existen numerosos estudios sobre estas comunidades en el Parque Nacional de Yellowstone (Brock, 1978; Ward et al., 1990; Ward et al., 1998; Blank et al., 2002; Meyer-Dombard et al., 2005; Allewalt et al., 2006; Miller et al., 2009) y algunas otras fuentes termales del mundo (Moyer et al., 1995; Skirnisdottir et al., 2000; Hongmei et al., 2005; Portillo et al., 2009b; Kubo et al., 2011; Bohorquez et al., 2012; Mackenzie et al., 2013) que comentaremos más adelante. Los estudios realizados han demostrado que los tapetes microbianos de fuentes termales albergan comunidades microbianas dominadas por dos divisiones, Cyanobacteria y Chloroflexi. La creencia general, establecida a lo largo de años de investigación, es que estos dos grupos interactúan entre sí y comparten zonas con temperaturas similares, de manera que Chloroflexi realizaría un metabolismo fotoheterótrofo a partir de compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por los fotoautótrofos, las cianobacterias (Ward et al., 1998). Además, el desarrollo de estos dos grupos forma una matriz de exopolisacáridos que constituye el núcleo de los tapetes microbianos termófilos en las fuentes termales (Brock, 1978; Ward et al., 1998). Recientemente, nuevas evidencias apuntan hacia una perspectiva diferente, ya que algunos Chloroflexi son capaces de crecer de forma fotoautótrofa, tanto en cultivos como *in situ* (van der Meer et al., 2003; Klatt et al., 2007), sugiriendo una posible competencia entre los dos grupos (Miller et al., 2009). Por tanto, las relaciones ecológicas

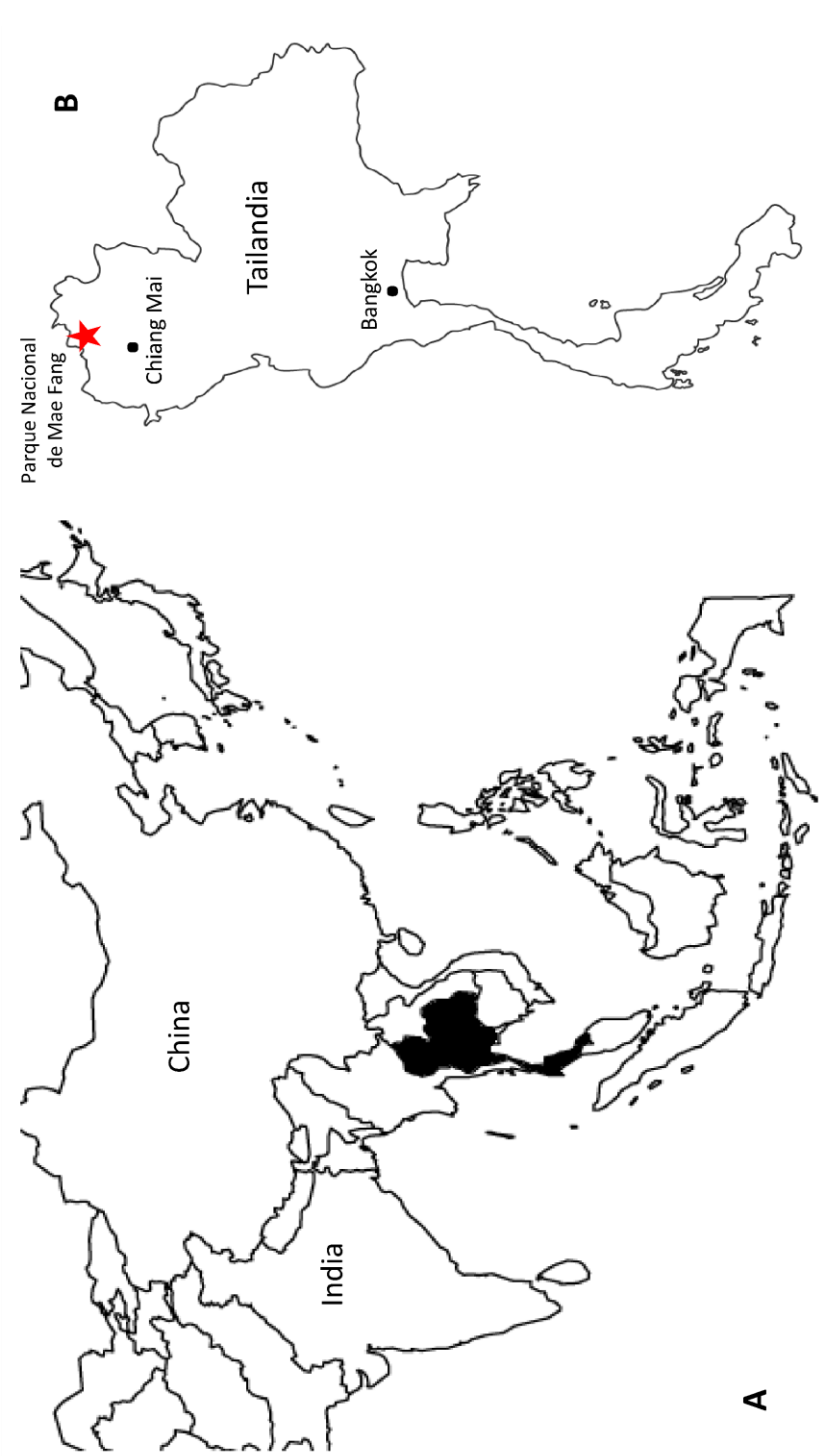
entre Cyanobacteria y Chloroflexi y sus consecuencias en la estructura de las comunidades de los tapetes microbianos termófilos requieren más investigación.

El objetivo de este estudio era investigar la distribución de las principales divisiones bacterianas y sus filotipos a lo largo de un amplio gradiente de temperatura (50°C; desde 40 a 90°C). Específicamente, entre las preguntas a analizar están evaluar cómo la temperatura determina la estructura de las comunidades microbianas y las relaciones entre las principales divisiones, Cyanobacteria y Chloroflexi.

## **2.3. Materiales y Métodos**

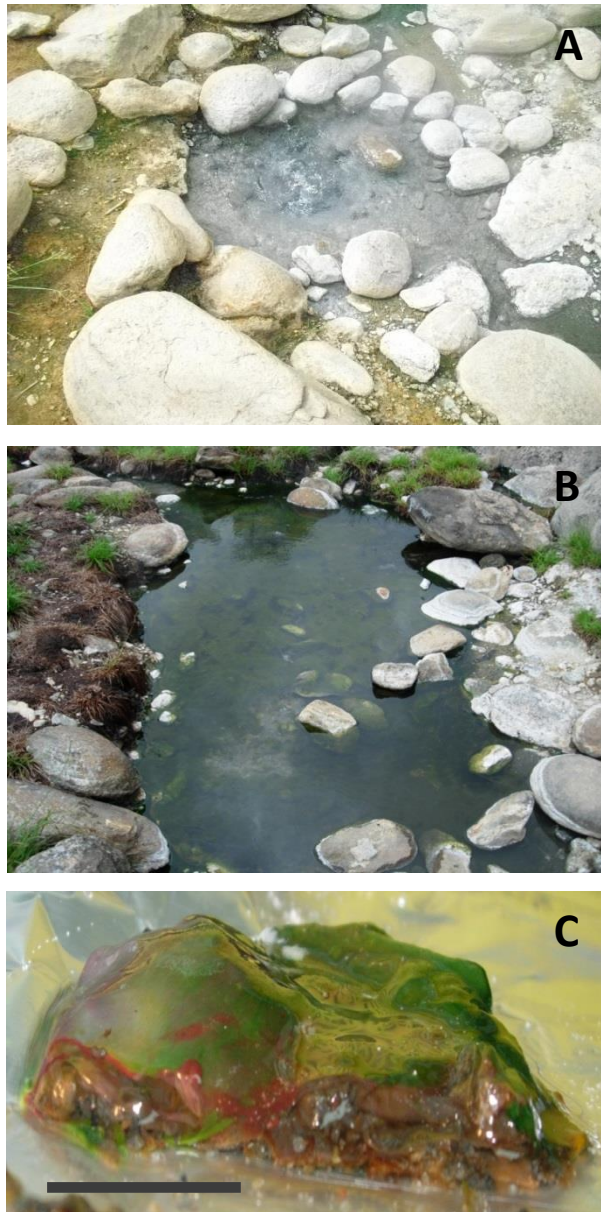
### **2.3.1. Puntos de muestreo**

Las muestras fueron tomadas de un arroyo proveniente de una fuente termal en Mae Fang (19° 57,93' N, 099° 09,26' E) (norte de Tailandia) (Figura 2.1). En el origen de la fuente termal (Figura 2.2) la temperatura era de 90°C y a lo largo del arroyo la temperatura disminuía hasta 40°C aproximadamente. Este rango de temperatura de 50°C se encontraba en aproximadamente 100 m. La estabilidad de las temperaturas en el arroyo de agua termal ha sido confirmada a lo largo de los años. No existe confluencia de otras aguas a lo largo de la zona del arroyo estudiado. El fondo del arroyo estaba cubierto por un tapete microbiano (Figura 2.2) excepto en las zonas con las temperaturas más altas (80°C y 90°C). La composición geoquímica del agua proveniente del punto de emanación de la fuente termal muestreada puede consultarse en la Tabla 1.1. Las muestras consistían en porciones de los tapetes microbianos o, si estos no existían, de los sedimentos del fondo del arroyo. En total, se recogieron nueve muestras por duplicado en intervalos de aproximadamente 5-10°C a lo largo del arroyo (90,0°C; 80,0°C; 75,0°C; 70,2°C; 65,0°C; 60,0°C; 55,7°C; 50,1°C; 39,9°C). Estas



**Figura 2.1.** Localización de la fuente termal objeto de estudio. **A.** Mapa del sureste de Asia, mostrando la localización de Tailandia. **B.** Localización del Parque Nacional de Mae Fang en el Norte de Tailandia.





**Figura 2.2.** Fotos tomadas en el lugar de muestreo en las fuentes termales de Mae Fang, Tailandia. **A.** Detalle del afloramiento (90°C). **B.** Vista del arroyo de la fuente termal con temperaturas que rondan los 60°C mostrando el tapete microbiano verde cubriendo el fondo. **C.** Porción del tapete microbiano recogido a 60°C (la barra indica 2 cm).

**Tabla 2.1.** Composición geoquímica de los elementos del agua en el punto de afloramiento de la fuente termal estudiada (Mae Fang, Tailandia).

Elemento	Concentración <sup>1</sup> (mg l <sup>-1</sup> )
Sodio	70,10
Cloro	10,80
Potasio	7,20
Calcio	1,89
Magnesio	0,10
Estroncio	0,08
Hierro	0,03
Cobalto	ND
Plomo	ND
Manganeso	ND
Níquel	ND
Fosfato	ND
Azufre disuelto	ND
Tungsteno	ND

<sup>1</sup> ND, No Detectado.

muestras fueron conservadas en RNAlater (Ambion, Austin, Estados Unidos), para preservar los ácidos nucleicos y mantenidas en hielo hasta su llegada al laboratorio (Portillo et al., 2009b). Para medir la temperatura utilizamos un termómetro digital con una microsonda termopar.

### **2.3.2. Caracterización de las comunidades microbianas**

Los principales componentes bacterianos de las comunidades se determinaron mediante amplificación por PCR del gen ARNr 16S, la obtención de los perfiles moleculares de las comunidades bacterianas mediante DGGE (“fingerprinting”), clonación y secuenciación parcial de dicho gen. Se llevaron a cabo dos repeticiones totalmente independientes, realizándose el análisis posterior sobre uno de los perfiles representativo de cada temperatura. Estudios previos de otras fuentes termales de Tailandia (Portillo et al., 2009b) sugirieron la existencia de una diversidad limitada en los tapetes microbianos de aguas termales y que los principales filotipos podían ser fácilmente detectados por análisis de electroforesis en gel con agentes desnaturalizantes (DGGE).

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit de extracción de ADN Nucleospin Food (Mackerey-Nagel, Düren, Alemania) (Portillo et al., 2009b). Para la amplificación por PCR de genes de ARNr utilizamos la polimerasa de ADN ExTaq (Takara, Shiga, Japón), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para un volumen final de 50  $\mu$ l, la mezcla de reacción contenía 1  $\mu$ l de solución de ADN molde (entre 10 y 100 ng ADN), 5  $\mu$ l del tampón de PCR recomendado con 2 mM (concentración final) de Cloruro de Magnesio, 4  $\mu$ l de la mezcla de los cuatro nucleótidos (0,2 mM, concentración final), 1  $\mu$ l de cada uno de los dos cebadores necesarios (1  $\mu$ M, concentración final), 0,25  $\mu$ l de la enzima polimerasa (1,25 unidades) y el volumen de agua, libre de ácidos nucleicos y nucleasas, necesario para completar la reacción hasta el volumen final. Las condiciones de temperatura para la reacción de amplificación

consistieron en los siguientes pasos: 95°C durante 2 minutos; 35 ciclos a 95°C durante 20 segundos (desnaturalización), 55°C durante 20 segundos (emparejamiento) y 72°C durante 1 minuto (extensión); y una incubación final a 72°C durante 10 minutos.

Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes ARNr 16S para la obtención de los perfiles moleculares fueron 341F-GC (5'-AAC ACG GGA GGC AGC AG con una cola rica en GC ligada al extremo 5') y 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG) (Muyzer et al., 1993). En este caso, el paso de extensión durante la PCR tenía una duración de 40 segundos, el paso de incubación final era 30 minutos y el número de ciclos 40.

Los perfiles moleculares de las comunidades bacterianas (“fingerprinting”) por la técnica DGGE (Muyzer et al., 1993) proporcionaron un patrón de bandas característico de cada comunidad. Estudios previos han descrito análisis de PCR-DGGE con cuantificación relativa de sus bandas (Portillo y González, 2008; Portillo et al., 2009b). Este estudio sigue estrictamente dicho protocolo incluyendo el uso de marcadores de migración tal y como se ha descrito anteriormente (Portillo et al., 2009a). Resumidamente, el gradiente químico desnaturante preparado en geles de poliacrilamida (Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1) al 8% con urea y formamida como agentes desnaturantes formando un gradiente final de 30% a 50%, siendo N-N'-N'-tetrametilendiamina (TEMED) y peroxodisulfato (APS) los agentes polimerizadores del gel.

La cubeta de electroforesis empleada era Dcode-System (Bio-Rad, Munich, Alemania). Los productos de PCR (15 µl) mezclados con el tampón de carga se cargaron en los pocillos de los geles de DGGE. Los marcadores de migración (*Pseudomonas aeruginosa* CECT 4122, *Escherichia coli* CECT 433, *Paenibacillus* sp. DSM 34 and *Streptomyces caviscabies* ATCC 21619) sirvieron para normalizar las distancias de migración entre distintos geles. La

electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante 210 minutos a 60°C en tampón TAE 0,5x (concentración 1x: 40mM HCl-Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA; pH 8,2). El ADN teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml) y visualizado en un transiluminador (2UVP, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Francia) fue fotografiado.

Se realizaron análisis de PCR-DGGE específicos para *Cyanobacteria* mediante una amplificación por PCR anidada. Una primera amplificación dirigida a los genes de ARNr 16S de las cianobacterias utilizando los cebadores *cya106F* (5'-CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A) y *cya781Ra+b* (5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T y 5'-GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTTT) (Nübel et al., 1997) seleccionaba las secuencias correspondientes a las cianobacterias. Una segunda amplificación del producto anterior utilizando los cebadores 341F-GC y 518R generaba las bandas de DGGE comparables a las obtenidas por el procedimiento general para bacterias.

Los distintos filotipos podían distinguirse por su migración en el gel de DGGE y dieron lugar al “fingerprinting” o perfil molecular característico de cada comunidad bacteriana. Para determinar si las diferencias observadas entre los perfiles de las distintas comunidades eran significativas seguimos el procedimiento estadístico descrito por Portillo y González (2008).

Para identificar los distintos filotipos bacterianos se llevó a cabo la clonación de los fragmentos amplificados por PCR. La amplificación por PCR de los genes ARNr 16S bacterianos para la clonación y su posterior secuenciación la realizamos con el par de cebadores 27bF (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG) (Portillo et al., 2009b) y 907R (5'-CCC CGT CAA TTC ATT TGA GTT T) (Lane, 1991). Para las cianobacterias, en la amplificación para la clonación y secuenciación de los genes ARNr 16S, utilizamos los cebadores *cya106F* y *cya781Ra+b*, tal y como ha quedado explicado anteriormente. Con los productos

de PCR, purificados con el kit “Jetquick PCR Product Purification Spin Kit” (Genomed, Löhne, Alemania), construimos genotecas de clones de genes ARNr 16S con el kit de clonación “TOPO-TA Cloning kit for secuencing” (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Los clones fueron seleccionados utilizando PCR-DGGE para la selección de las secuencias por comparación de las bandas principales visualizadas en los perfiles moleculares de las comunidades (González et al., 2003). El proceso de amplificación llevado a cabo para la selección de clones consistió en un primer paso de amplificación con los cebadores M13R y T7 propios del vector de clonación utilizado que amplifican la secuencia insertada en dicho vector. En el segundo paso de la PCR anidada amplificábamos con los cebadores 341F-GC y 518R el fragmento de ADN empleado en la DGGE. Las condiciones de la reacción de PCR diferían del caso general descrito previamente en que contenían 2 µl de ADN molde, 1 µl de mezcla de nucleótidos y la polimerasa utilizada fue la enzima BioTaq (Bioline, Randolph, Massachussets, Estados Unidos) con adición de Cloruro de Magnesio (1,5 mM, concentración final). Los clones de ARNr 16S seleccionados tras extraer el plásmido con el kit de purificación de plásmidos “JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit” (Genomed, Löhne, Alemania) fueron secuenciados por un servicio comercial externo (Secugen S. L., Madrid, España).

### **2.3.3. Identificación de bacterias y diferenciación de sus comunidades**

Los taxones bacterianos se diferenciaron por el porcentaje de similitud entre las secuencias del gen ARNr 16S, distinguiéndose los niveles de 97% y 99% de similitud de secuencia y su pertenencia a divisiones diferentes, lo que permitió agrupar las secuencias en OTUs (“Operational Taxonomic Unit” o Unidad Taxonómica Operativa) (Zimmermann et al., 2005). Un nivel del 97% de similitud se ha relacionado aproximadamente con el nivel de especie (Rosselló-

Mora y Amann, 2001). El nivel del 99% de similitud ha sido utilizado para discriminar entre microorganismos distintos (Horner-Devine et al., 2004). Los resultados de la búsqueda de homólogos realizada con el algoritmo Blastn (Altschul et al., 1990) frente a las bases de datos de ADN (GenBank; NCBI, “National Center for Bioinformation”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) determinaron la clasificación de las secuencias en diferentes divisiones bacterianas. Las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas durante este estudio están disponibles con los números de acceso del HQ416721 al HQ416869, aquellas generadas con cebadores para Bacteria, y del HQ416870 al HQ416899 las secuencias generadas con cebadores específicos de Cyanobacteria. Se construyeron curvas de cobertura según Hughes y Hellmann (2005) basadas en las OTUs estimadas a los diferentes niveles de similitud.

Para cada uno de los perfiles moleculares o “fingerprints”, se calculó el índice de diversidad de Shannon (Hill et al., 2003) y el número de OTUs de bacterias y cianobacterias, normalizado según el número de secuencias analizadas a cada temperatura. La distancia filogenética entre OTUs fue el resultado de la fracción de nucleótidos diferentes al alinear y comparar las secuencias del gen ARNr 16S utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). El índice de similitud de Bray-Curtis (Woodward et al., 2010) permitió comparar comunidades microbianas de las distintas temperaturas.

Para evaluar la significación de los resultados realizamos el test de Mantel con el paquete vegan de R (Oksanen et al., 2011). Específicamente este test permite (i) evaluar el nivel de significación de la asociación entre distancia filogenética y distancia ambiental, ésta última determinada por la temperatura *in situ* y (ii) determinar el nivel de significación de la diferente diversidad a distintas temperaturas. Estos tests confirman la divergencia entre los resultados obtenidos y la aleatoriedad.

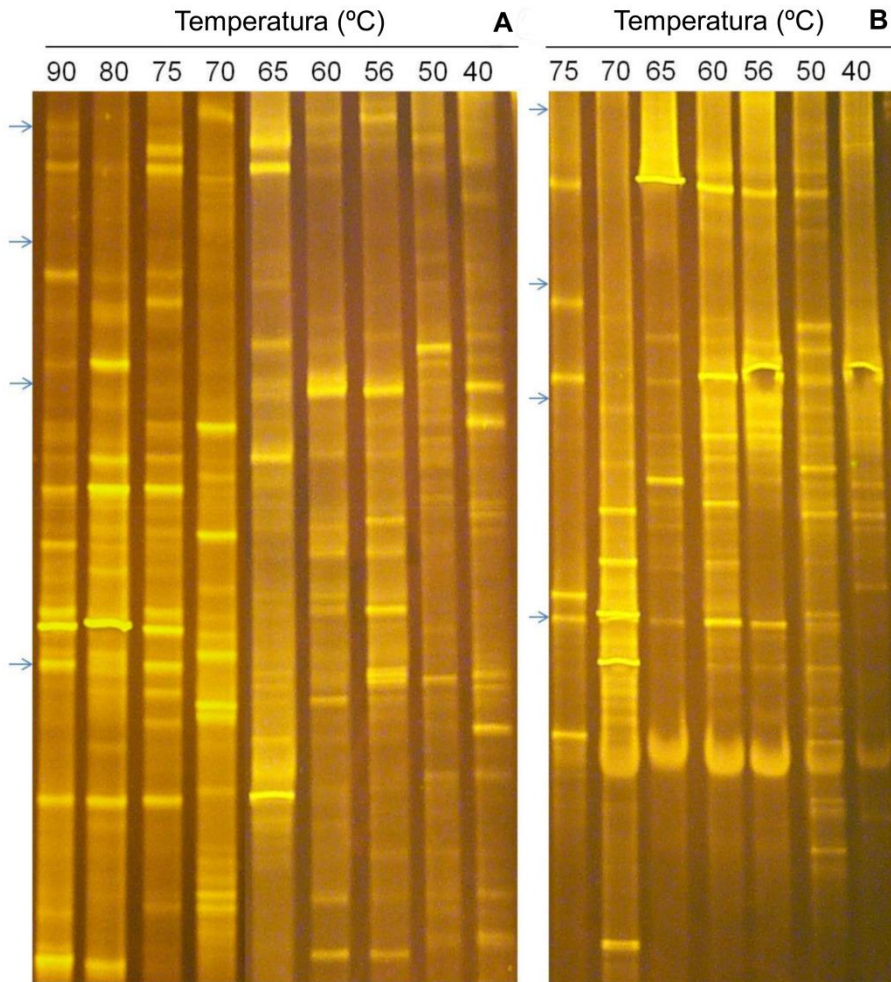
### 2.3.4. Análisis filogenéticos

Las secuencias alineadas (véase arriba) fueron procesadas con el programa Treepuzzle (Strimmer y von Haeseler, 1996) para construir árboles filogenéticos mediante el método “maximum likelihood quartet puzzling”. Estos dendrogramas muestran las relaciones filogenéticas entre las secuencias analizadas. Los valores de fiabilidad calculados para cada bifurcación indicaban el número de veces (en porcentaje) que ésta había sido reconstruida durante el proceso de construcción iterativa (1.000 estimaciones). Con el fin de obtener un árbol filogenético conservador, se simplificaron las bifurcaciones cuando el valor obtenido para una bifurcación era inferior al 50% (Stott et al., 2008). El número de nucleótidos utilizado en la construcción de estos árboles fue 760 y 790 nucleótidos para *Chloroflexi* y *Cyanobacteria*, respectivamente. *Thermotoga neapolitana* (número de acceso AB039768) fue utilizado como referencia (“outgroup”) para la construcción de estos árboles.

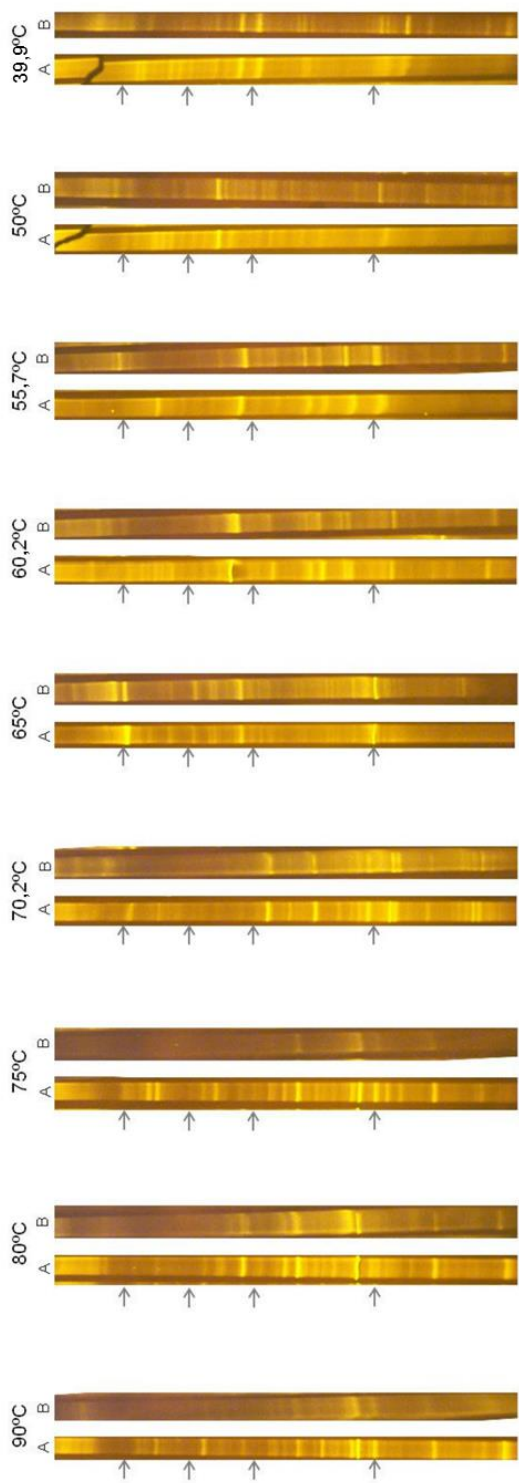
## 2.4. Resultados

Las comunidades microbianas en la fuente termal de Mae Fang variaban en función de la temperatura. Las diferencias entre los patrones de bandas de estas comunidades eran significativas ( $P < 0,05$ ; Portillo y González, 2008). Cada uno de los filotipos encontrados se detectaron en un rango de temperatura reducido (generalmente menor de 10°C). Estos resultados eran comunes a los perfiles moleculares obtenidos tanto con cebadores para bacterias (Figura 2.3A) como para cianobacterias (Figura 2.3B). Las réplicas obtenidas para cada perfil molecular pueden observarse en la Figura 2.4.





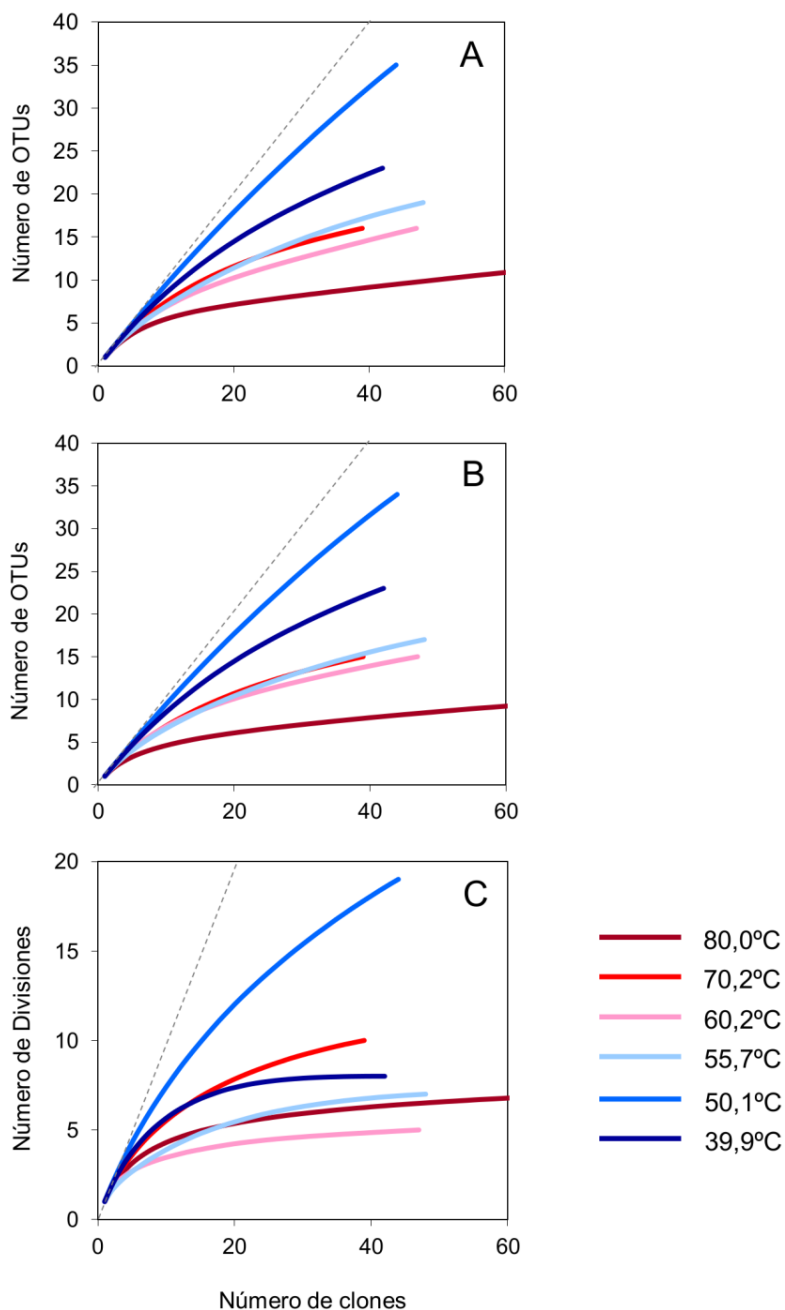
**Figura 2.3.** Perfiles moleculares de las comunidades bacterianas, obtenidos mediante DGGE, a lo largo de un rango de 50°C en una fuente termal de Mae Fang (Tailandia). Se muestran los perfiles moleculares obtenidos con cebadores para Bacteria (A) y cebadores específicos para Cyanobacteria (B). Las flechas indican la posición de los marcadores de migración que (de arriba a abajo) corresponden a *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*.



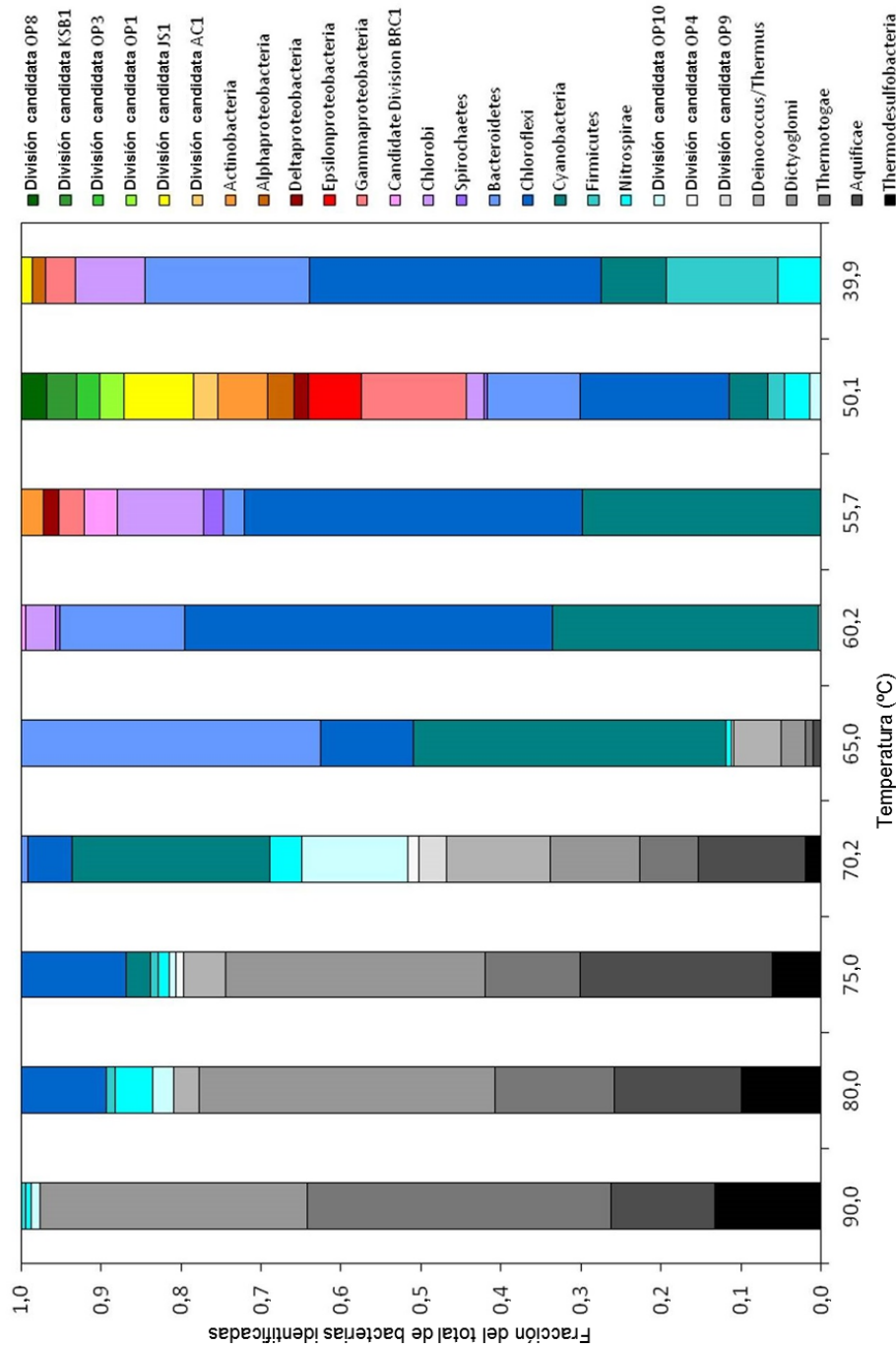
**Figura 2.4.** Réplicas de los perfiles moleculares de las comunidades bacterianas obtenidos mediante DGGE a lo largo de un gradiente de temperatura de 50°C en una fuente termal de Mae Fang (Tailandia). Las flechas indican la posición de los marcadores de migración que (de arriba a abajo) corresponden a *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*.

Las curvas de cobertura (Figura 2.5) mostraron una clara tendencia hacia una asíntota horizontal divergiendo de la recta 1:1. Las curvas obtenidas para los niveles de similitud del 97% y 99% fueron similares, lo que sugiere que la diferenciación de las OTUs tenía lugar mayoritariamente por debajo del nivel de “especie” (por debajo del 97% de similitud en los genes ARNr 16S). Debido a la proximidad de las curvas a su asíntota horizontal, podemos deducir que en este estudio logramos detectar la mayoría de las divisiones que poblaban las muestras estudiadas. En el caso de la comunidad microbiana observada a 50°C, la curva de cobertura no alcanzó dicha asíntota horizontal debido a la existencia de un pico de gran diversidad a esta temperatura.

A lo largo del gradiente, pudimos detectar la distribución de distintas divisiones bacterianas que correspondían con microorganismos hipertermófilos, termófilos y mesófilos, desde las temperaturas más altas a las más bajas (Figura 2.6). Los hipertermófilos dominaban en las temperaturas más altas (de 90°C a 70°C) e incluían principalmente las divisiones Dictyoglomi, Thermotogae y Aquificae. Otras fracciones más reducidas dentro de estas comunidades estaban representadas por los grupos *Thermodesulfovibrio* y *Deinococcus-Thermus*. Estos hipertermófilos representaban el 98%, 81%, 80%, 47% y 11% de las comunidades bacterianas a 90°C, 80°C, 75°C, 70°C y 65°C, respectivamente, y no se detectaban por debajo de 65°C. Alrededor de los 70°C, detectamos algunas divisiones raramente o no cultivadas y mayoritariamente desconocidas, tales como las divisiones candidatas OP4, OP9 y OP10 (Armatimonadetes), lo que sugiere la adaptación a condiciones termófilas de los miembros de estas divisiones candidatas. Por ejemplo, la división Armatimonadetes, anteriormente conocida como división candidata OP10 (Tamaki et al., 2011), estaba presente como un componente importante de la comunidad bacteriana a 70°C (13%) y representaba fracciones inferiores de las comunidades hasta 90°C. Este hallazgo sugiere que los miembros de Armatimonadetes pueden habitar ambientes a



**Figura 2.5** Curvas de cobertura para las comunidades microbianas analizadas a lo largo del gradiente de temperatura estudiado en función de su nivel de similitud (A, 99%; B, 97%; C, División). También se muestra la recta 1:1 (línea discontinua) como referencia.



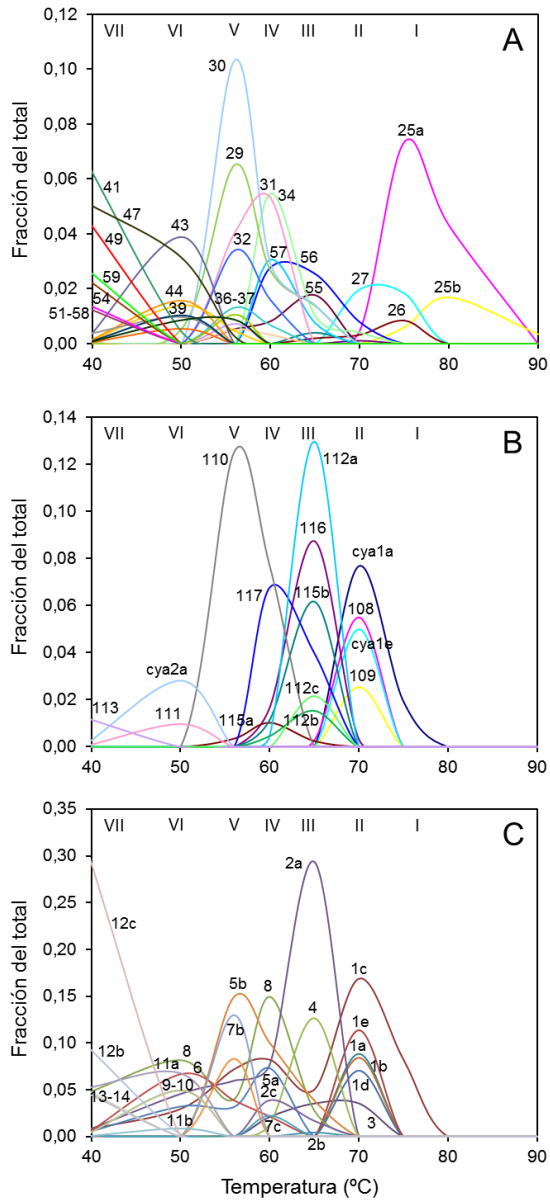
**Figura 2.6.** Abundancia relativa de las principales divisiones bacterianas detectadas a lo largo de un gradiente de temperatura de 50°C en una fuente termal de Mae Fang (Tailandia).

temperaturas superiores a las descritas anteriormente (Stott et al., 2008; Portillo y González 2009).

El rango de temperaturas entre 70°C y 75°C representa el límite superior de temperatura en la distribución de las cianobacterias. Las bacterias termófilas dentro de la división Cyanobacteria, Chloroflexi y Bacteroidetes dominaban el rango de temperatura de 55°C a 65°C. A 65°C, el 39% de la comunidad bacteriana pertenecía a Cyanobacteria y esta división constituía más del 20% de la comunidad en el rango de temperatura de 55°C a 70°C. Chloroflexi suponía una fracción importante de las comunidades entre 40°C y 80°C con un pico máximo a 60°C (46% de la comunidad bacteriana). Cyanobacteria y Bacteroidetes presentaban abundancias relativas similares a 65°C. Bacteroidetes representaba el 37% de la comunidad bacteriana a 65°C y el 21% a 40°C.

A 50°C, la mayoría de las divisiones termófilas seguían siendo detectables y compartían el entorno con mesófilos y termófilos moderados. A esta temperatura (50°C) se detectaron numerosas divisiones no cultivadas (por ejemplo, las divisiones candidatas AC1 BRC1, KSN1, JS1, OP1, OP3, OP8, KSB1). Así, 50°C fue la temperatura que presentaba la mayor diversidad detectada en este estudio. Proteobacteria y Actinobacteria se detectaron a, y por debajo de, 55°C. A 40°C, la comunidad bacteriana estaba constituida principalmente por las divisiones (en orden decreciente de abundancia) Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Chlorobi, Cyanobacteria, Nitrospirae, Proteobacteria y la división candidata JS1.

La mayoría de las OTUs de la fuente termal estudiada (considerando el nivel de similitud del 99%) fueron detectadas dentro de un rango de temperatura relativamente estrecho, generalmente  $\leq 10^\circ\text{C}$  (Figura 2.7). Las OTUs se extendían como mucho unos pocos grados arriba y abajo de su aparente temperatura óptima. La Figura 2.7 muestra la distribución de las principales

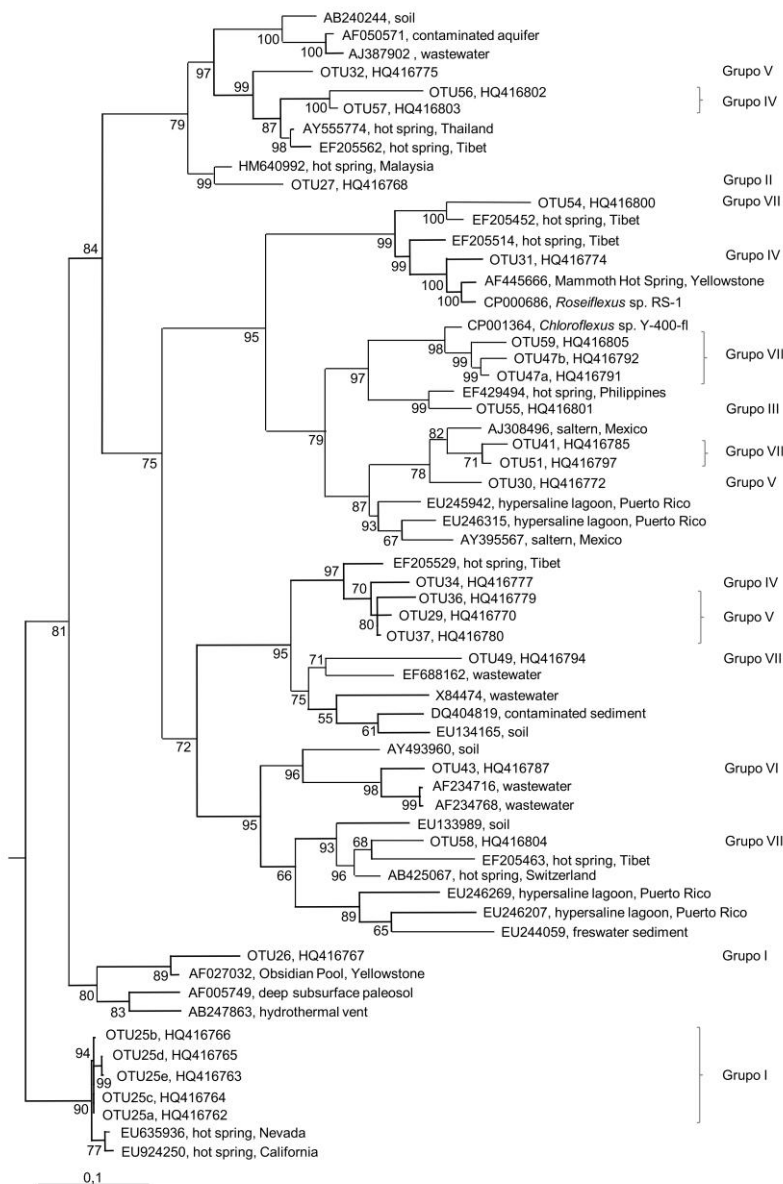


**Figura 2.7.** Distribución de los principales filotipos dentro de las divisiones Chloroflexi (A) y Cyanobacteria (B y C) a lo largo del gradiente de temperatura en la fuente termal de Mae Fang. Se muestran los análisis de las cianobacterias detectadas en este estudio utilizando los cebadores para el Dominio Bacteria (B) y cebadores específicos de Cyanobacteria (C). Los grupos determinados en función de la temperatura *in situ* se indican en la parte superior de cada figura utilizando números romanos.

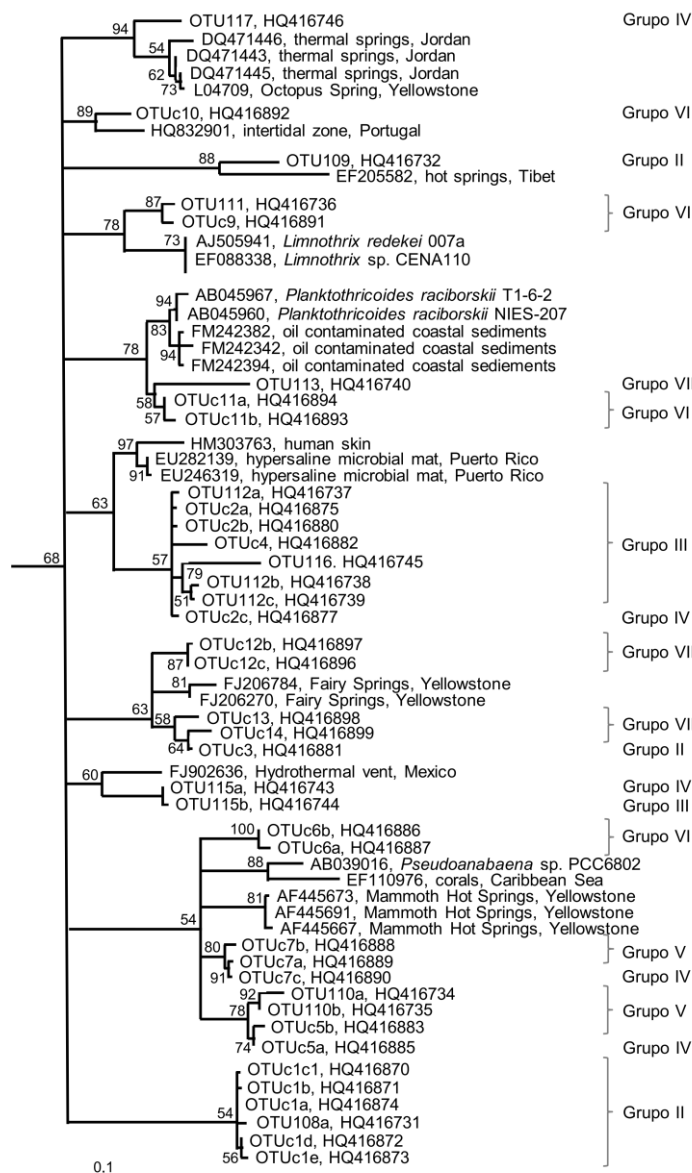
OTUs de Chloroflexi y Cyanobacteria a lo largo del gradiente de temperatura estudiado. Las OTUs de estas dos divisiones pueden clasificarse en siete grupos principales según su dominancia a una temperatura determinada (Figura 2.7). El grupo I estaba representado por las OTUs de Chloroflexi 25a, 25b y 26, detectadas entre 75°C y 85°C; la división Cyanobacteria no se detectó por encima de 75°C. El grupo II era el dominante a 70°C y estaba representado por las OTUs 1a, 1e, 108 y 109 de cianobacterias y la OTU 27 de Chloroflexi, dominante en esta división alrededor de 70°C. El grupo III (alrededor de 65°C) estaba dominado por Cyanobacteria e incluye las OTUs 112a, 112b, 112c, 115b y 116 de esta división. Entre los representantes de Chloroflexi del grupo III se encontraban las OTUs 55 y 56, las cuales mostraron una representación relativamente baja comparado con Cyanobacteria a esta temperatura. Las OTUs más importantes de Cyanobacteria pertenecientes al grupo IV (60°C) fueron 115a y 117. En Chloroflexi, el grupo IV estaba representado por las OTUs 31, 34 y 57. El grupo V (55°C) estaba representado por la OTU 110 de cianobacterias y las OTUs 29, 30, 32 y 36-37 de Chloroflexi. La comunidad de cianobacterias pertenecientes al grupo VI (50°C) estaba constituida principalmente por las OTUs 2a y 111, y la de Chloroflexi por la OTU 43 entre otras que representaban fracciones minoritarias de la comunidad bacteriana a 50°C. El grupo VII (40°C) se correspondía con los mesófilos y estaba representado por las OTUs 41, 47, 49, 51, 54 y 59 de Chloroflexi (entre otros en menor proporción) y la OTU 113 de cianobacterias.

Los análisis filogenéticos de las dos divisiones bacterianas más representativas, Chloroflexi y Cyanobacteria, detectadas en la fuente termal de Mae Fang estudiada, se muestran en las Figuras 2.8 y 2.9, respectivamente. Las OTUs que habitan un rango de temperatura específico suelen agruparse dentro de una misma rama filogenética o en ramas cercanas. Esto sugiere una relación entre proximidad filogenética y similitud de condiciones ambientales. Sin embargo, otras OTUs distantes filogenéticamente también podrían tener una temperatura





**Figura 2.8.** Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los diferentes filotipos de la división Chloroflexi detectados en este estudio y otras secuencias relacionadas. Se indican los grupos de temperatura correspondientes a las OTUs de Chloroflexi. La barra indica el porcentaje de nucleótidos sustituidos. Los valores de fiabilidad son el resultado de 1000 iteraciones. Los grupos corresponden a las siguientes temperaturas: Grupo I, 75°C; Grupo II, 70°C; Grupo III, 65°C; Grupo IV, 60°C; Grupo V, 55°C; Grupo VI, 50°C; Grupo VII, 40°C.



**Figura 2.9.** Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los diferentes filotipos de la división Cyanobacteria detectados en este estudio y otras secuencias relacionadas. Se indican los grupos de temperatura correspondientes a las OTUs de Cyanobacteria. La barra indica el porcentaje de nucleótidos sustituidos. Los valores de fiabilidad son el resultado de 1000 iteraciones. Los grupos corresponden a las siguientes temperaturas: Grupo I, 75°C; Grupo II, 70°C; Grupo III, 65°C; Grupo IV, 60°C; Grupo V, 55°C; Grupo VI, 50°C; Grupo VII, 40°C.

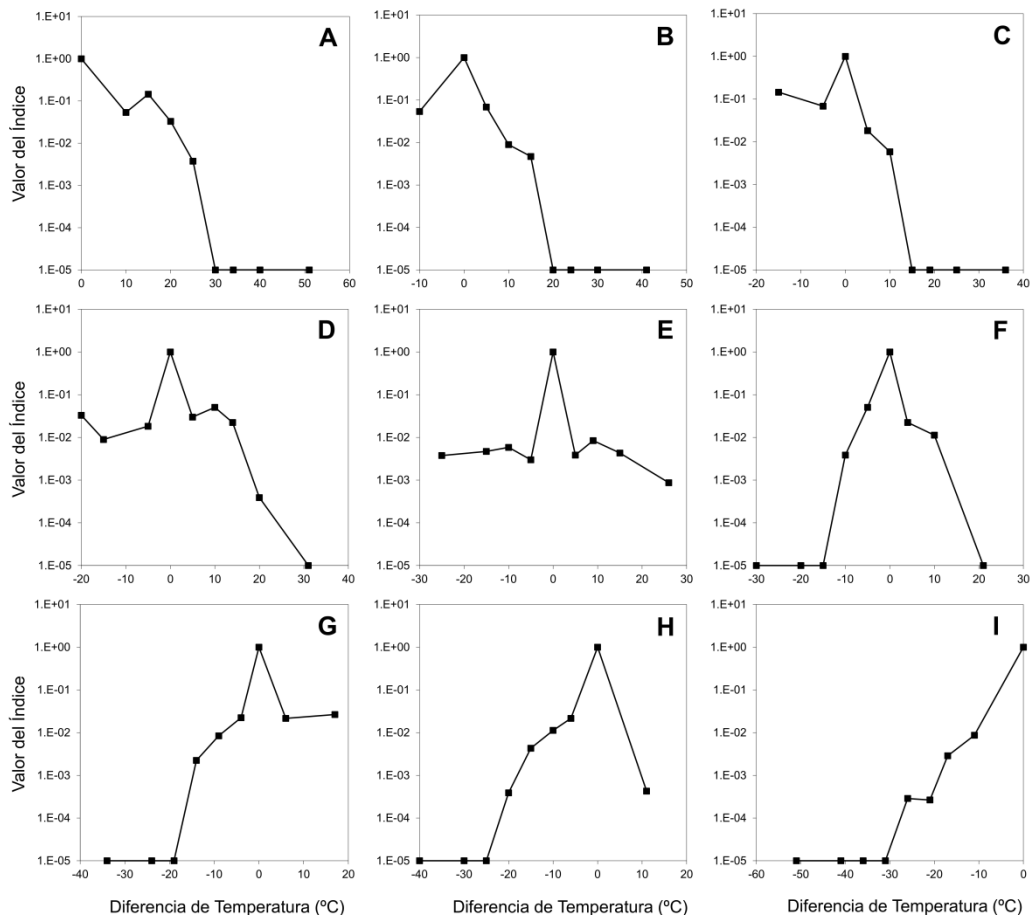
óptima similar lo que sugiere que más de un linaje podría adaptarse a unas condiciones ambientales específicas.

La relación entre la similitud de las comunidades y la distancia ambiental (representada por la diferencia de temperatura) se analizó entre pares de comunidades utilizando el índice de Bray-Curtis. El índice de similitud disminuía considerablemente al aumentar la diferencia de temperatura entre las muestras comparadas (Figura 2.10). Los tests de Mantel confirmaron la importancia de esta relación ( $P < 0,05$ ). Por lo general, para diferencias de temperatura mayores de 20°C sólo se observaban similitudes mínimas.

Las estimaciones comparativas del índice de Shannon y de la riqueza de especies mostraron picos de valores máximos a 50°C y 70°C, tanto al 99% de similitud de OTUs como a nivel de división, siendo la temperatura de 50°C la que mostraba el mayor número de filotipos. La zona entre 50°C y 70°C era una zona de relativamente baja diversidad donde dominaban Cyanobacteria, Chloroflexi y Bacteroidetes. Para comprobar que estos picos de diversidad máxima eran significativos se analizó la diversidad de filotipos bacterianos ( $P = 0,0034$ ) y de sus divisiones ( $P = 0,0033$ ) y el índice de Shannon ( $P = 0,0191$  y  $P = 0,0045$  al nivel del 99% y de división, respectivamente). Estos picos de diversidad parecen representar un efecto frontera (“edge effect”) donde confluyen las OTUs que se desarrollan óptimamente a temperaturas por encima y por debajo de 50°C y 70°C. Estas dos temperaturas marcaban los límites entre mesófilos, termófilos e hipertermófilos.

## **2.5. Discusión**

El análisis de las comunidades microbianas a lo largo de un gradiente de temperatura de 50°C reveló que los diferentes filotipos se distribuían dentro de



**Figura 2.10.** Valores del índice de similitud de Bray-Curtis entre las comunidades bacterianas a lo largo del gradiente de temperatura estudiado. Las comparaciones corresponden con cada una de las muestras estudiadas a 90,0°C (A), 80,0°C (B), 75,0°C (C), 70,2°C (D), 65°C (E), 60,2°C (F), 55,7°C (G), 50,1°C (H) y 39,9°C (I).

rangos de temperatura estrechos, por lo que las condiciones que permiten un desarrollo óptimo en el ambiente son muy limitadas. Algunos filotipos coexisten bajo condiciones de temperatura específicas. Los filotipos cercanos filogenéticamente son más propensos a compartir condiciones ambientales que los filotipos distantes dentro de una misma división. Este hecho se ha demostrado para las dos divisiones principales en el entorno estudiado, Cyanobacteria y Chloroflexi. La distribución de los filotipos bacterianos a lo largo de un gradiente de temperatura de 50°C muestra un ambiente muy estructurado con máximos de diversidad a 50°C y 70°C, temperaturas que definen el rango de distribución para mesófilos, termófilos e hipertermófilos, respectivamente.

Los microorganismos que componen las comunidades estudiadas se podrían clasificar en tres grandes grupos según la temperatura de muestreo: hipertermófilos (por encima de 70°C), termófilos (50°C-70°C) y mesófilos (por debajo de 50°C). Estos grupos están bien definidos por las condiciones de temperatura y la distribución de los microorganismos detectados durante este estudio. Además, los efectos frontera observados a estas temperaturas concretas (50°C y 70°C) permiten definir ecotonos con diversidad elevada. En la fuente termal estudiada, cada uno de estos tres grupos (mesófilos, termófilos e hipertermófilos) habita un rango de temperatura, por lo general, restringido a los límites definidos por 50°C y 70°C (Itoh y Iino, 2013; Stetter et al., 1990).

Determinados grupos bacterianos no cultivados (es decir, de divisiones candidatas) parecían adaptados a estos ecotonos sugiriendo que estos grupos necesitan un rango de condiciones ambientales bien definido y un posible requerimiento de interacciones metabólicas con los microorganismos con los que comparten estos nichos. Esta información podría explicar las dificultades actuales para cultivar representantes de las divisiones no cultivadas, o difíciles de cultivar, y podría ser útil a la hora de diseñar nuevos métodos de cultivo para estas bacterias.

Curiosamente, la distribución de los microorganismos (representados por OTUs) en el ambiente estudiado está lejos de ser uniforme a lo largo de un rango de temperatura razonable. Más bien, microorganismos diferentes, aparentemente adaptados a condiciones ligeramente distintas, se encuentran compartimentados en zonas caracterizadas por rangos de temperatura relativamente estrechos. Así, el gradiente de temperatura estudiado, que abarca 50°C, se encuentra estructurado con diferentes microorganismos capaces de competir con otros que se desarrollan bajo condiciones ligeramente diferentes rellenoando completamente los hábitats disponibles. Estas observaciones permiten describir la complejidad de las comunidades microbianas en ambientes naturales y específicamente en fuentes termales.

Los rangos de temperatura en los que se distribuye cada OTU a lo largo del gradiente son más estrechos que los descritos generalmente para las bacterias cultivadas bajo condiciones de laboratorio. Estos resultados sugieren que los microorganismos en la naturaleza presentan diferente comportamiento al observado cuando son aislados y crecidos bajo experimentación en el laboratorio. Mientras que la mayoría de las OTUs se detectaban dentro de un rango de <10°C, los cultivos a menudo muestran crecimiento en un rango de, al menos, 20-40°C, incluyendo una temperatura óptima dentro de ese intervalo (Madigan et al., 2003; Wiegel, 1990). Por tanto, podemos deducir que las condiciones para el crecimiento de microorganismos específicos en un entorno natural son bastante restrictivas y los microbios compiten y conviven con otros microorganismos dentro de un estrecho margen ecológico de condiciones ambientales. La distribución restrictiva observada para las distintas OTUs a lo largo del gradiente de temperatura sugiere que existe una fuerte competitividad (y probablemente también estrictas interacciones positivas y negativas entre microorganismos) en el entorno estudiado. Estas observaciones constituyen una posible explicación para la alta diversidad detectada en los sistemas naturales

donde la variabilidad genética y fenotípica permite que distintas bacterias compartan un mismo ambiente bajo estrictas condiciones ambientales.

Los resultados han mostrado que la distancia filogenética está relacionada con las condiciones ambientales. La distancia ambiental (determinada por la temperatura) sugiere una diferenciación filogenética mientras que la proximidad aumenta las posibilidades de detección de representantes filogenéticamente cercanos. Las células aparentemente están obligadas a vivir en nichos relativamente estrechos. La distancia ambiental aumenta la presión evolutiva hacia cambios filogenéticos dirigidos a una mejor adaptación a esas condiciones diferentes (Telford et al., 2006). En bacterias se ha sugerido una posible relación entre grupos taxonómicos y área de muestreo (Horner-Devine et al., 2004) como había sido descrito previamente para organismos superiores (Bell et al., 2005; Harte et al., 1999; Lawton, 1999). En nuestro estudio, la temperatura define ambientes característicos que permiten el desarrollo de microorganismos específicos, limitando el crecimiento de otros. Así, células específicas encuentran nichos y ventanas de oportunidad en unas condiciones bien definidas donde determinadas OTUs se pueden desarrollar dirigidas por estrechas interacciones con otras bajo condiciones similares o ligeramente diferentes. Esta organización y compartimentación de las oportunidades ambientales estructura el gradiente de temperatura completo maximizando la diversidad y funcionalidad dentro del sistema.

Cyanobacteria y Chloroflexi son las dos divisiones más representativas en los tapetes microbianos en la fuente termal de Mae Fang dentro del rango de temperatura de 50°C a 65°C. Recientemente, se ha abierto un debate sobre la coexistencia (Brock, 1978; Portillo et al., 2009b; Ward et al., 1998) o exclusión (Klatt et al., 2007; Miller et al., 2009; van der Meer et al., 2003) entre estos dos grupos. Este estudio sugiere que ambas hipótesis podrían explicar la distribución y las interacciones entre Cyanobacteria y Chloroflexi en fuentes termales.

Algunos representantes comparten nichos sugiriendo una posible interacción metabólica mientras que en otros rangos de temperatura, aparentemente, una de las divisiones queda prácticamente excluida. Por ejemplo, en el rango de temperatura entre 55 y 60°C, representantes de Cyanobacteria y Chloroflexi comparten entorno (grupos IV y V). Sin embargo, el rango entre 65 y 70°C está mayoritariamente dominado por representantes de cianobacterias (grupos II y III). A 75°C o más, los representantes de Chloroflexi presentan una proporción de la comunidad mayor que los representantes de Cyanobacteria. En estas temperaturas (75°C y superiores), la exclusión de la división Cyanobacteria también puede ser una consecuencia de la inhibición de la fotosíntesis por la temperatura (Allewalt et al., 2006). Aunque está fuera del ámbito de este estudio, la limitación de la fotosíntesis a 75°C no parece ser una consecuencia de la maquinaria fotosintética, como sugieren recientes medidas de actividad fotosintética a altas temperaturas (Allewalt et al., 2006; Sheridan y Ulik, 1976), sino que más bien podría ser atribuida a daños estructurales en estas células, por ejemplo, en la integridad de sus membranas a esas temperaturas. La diferente distribución de los representantes de Chloroflexi y Cyanobacteria sugiere que las posibles diferencias en la fisiología de estas dos divisiones bacterianas podrían regirse por la temperatura. Las interacciones observadas entre los microorganismos y su medio ambiente no siempre son fáciles de entender. Los resultados presentados sugieren que las condiciones ambientales y las interacciones ecológicas (por ejemplo, competencia y mutualismo) entre diferentes representantes determinan, en última instancia, la distribución espacial de distintos filotipos en fuentes termales.

## 2.6. Conclusiones

Un sistema modelo, tal y como es el amplio gradiente de temperatura encontrado en una fuente termal, ha resultado de gran valor para describir los patrones de



distribución de microorganismos en el sistema estudiado con importantes consecuencias para otros ambientes (Jessup et al., 2004). Una variedad de diferentes filotipos se distribuye de forma altamente compartimentada a lo largo del gradiente de temperatura completo. La diversidad observada fue el resultado de la variabilidad existente en y entre grupos taxonómicos y divisiones bacterianas. El estrecho margen de temperatura donde la mayoría de los filotipos se desarrollan indica una fuerte selección ambiental e interacciones ecológicas restrictivas entre los miembros de las comunidades bacterianas en la fuente termal estudiada. La extrapolación de la información recabada en un ambiente modelo de alta temperatura a otros ambientes naturales, contribuye significativamente a explicar parcialmente la elevada complejidad y diversidad microbianas existentes en la naturaleza.

## 2.7. Bibliografía

- Allewalt, J. P., Bateson, M. M., Revsbech, N. P., Slack, K., Ward, D. M. (2006) Effect of temperature and light on growth and photosynthesis by *Synechococcus* isolates typical of those predominating in the Octopus Spring Microbial Mat Community of Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 544-550.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Baas-Becking, L. G. M. (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. van Stockum, W. P. & Zoon, Amsterdam.
- Bell, T., Ager, D., Song, J-I., Newman, J. A., Thompson, I. P., Lilley, A. K., van der Gast, C. J. (2005) Larger islands house more bacterial taxa. *Science* 308: 1884.
- Blank, C. E., Cady, S. L., Pace, N. R. (2002) Microbial composition of near-boiling silica depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5123-5135.
- Bohorquez, L. C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., Junca, H., Baena, S., Zambrano, M. M. (2012) In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. *Microb. Ecol.* 63: 103-115.
- Brock, T. D. (1978) *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Springer, New York.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 10494-10499.
- Fenchel, T., Finlay, B. J. (2003) Is microbial diversity fundamentally different from biodiversity of larger animals and plants? *Eur. J. Protistol.* 39: 486-490.

- Gonzalez, J. M., Ortiz-Martinez, A., Gonzalez-del Valle, M. A., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C. (2003) An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *J. Microbiol. Methods* 55: 459-463.
- Harte, J., McCarthy, S., Taylor, K., Kinzig, A., Fischer, M. L. (1999) Estimating species-area relationships from plot to landscape scale using species spatial-turnover data. *Oikos* 86: 45-54.
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., Moffett, B. F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 1-11.
- Hongmei, J., Aitchison, J. C., Lacap, D. C., Peerapornpisal, Y., Sompong, U., Pointing, S. B. (2005) Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacterial mats from China, the Philippines and Thailand. *Extremophiles* 9: 325-332.
- Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., Bohannon, B. J. M. (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432: 750-753.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J. (2005) The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods Enzymol.* 397: 292-308.
- Itoh, T., Iino, T. (2013) Phylogeny and biological features of thermophiles. In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kwarabiyasi, Y. (eds.) *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: biotechnology of thermophiles*. Springer, Dordrecht.
- Jessup, C. M., Kassen, R., Forde, S. E., Kerr, B., Buckling, A., Rainey, P. B., Bohannon, B. J. M. (2004) Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends Ecol. Evol.* 19: 189-197.
- Klatt, C. G., Bryant, D. A., Ward, D. M. (2007) Comparative genomics provides evidence for the 3-hydroxypropionate autotrophic pathway in filamentous anoxygenic phototrophic bacteria and in hot spring microbial mats. *Environ. Microbiol.* 9: 2067-2078.

- Kubo, K., Knittel, K., Amann, R., Fukui, M., Matsuura, K. (2011) Sulfur metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa Hot Spring. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 293-302.
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester.
- Lawton, J. H. (1999) Are there general laws on ecology? *Oikos* 84: 177-192.
- Mackenzie, R., Pedrós-Alió, C., Díez, B. (2013) Bacterial composition of microbial mats in hot springs in Northern Patagonia: variations with seasons and temperature. *Extremophiles* 17: 123-36.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003) *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall Inc., New Jersey.
- Martiny, J. B. H., Bohannon, B. J. M., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Øvreås, L., Reysenbach, A.-L., Smith, V. H., Staley, J. T. (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 102-112.
- Meyer-Dombard, D. R., Shock, E. L., Amend, J. P. (2005) Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park USA. *Geobiology* 3: 211-227.
- Miller, S. R., Strong, A. L., Jones, K. L., Ungerer, M. C. (2009) Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4565-4572.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C., Karl, D. M. (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1555-1562.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of

- polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nübel, U., García-Pichel, F., Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, H. H., Wagner, H. (2011) Vegan: community ecology package. R package v.2.0-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan> (last visited May 6th, 2014)
- Portillo, M. C., Gonzalez, J. M. (2008) Statistical differences between molecular fingerprints from microbial communities. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 94:157-163.
- Portillo, M. C., Gonzalez, J. M. (2009) Members of the Candidate Division OP10 are spread in a variety of environments. *World J. Microb. Biotech.* 25: 347-352.
- Portillo, M. C., Saiz-Jimenez, C., Gonzalez, J. M. (2009a) Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of "white colonizations" in the Altamira Cave, Spain. *Res. Microbiol.* 160: 41-47.
- Portillo, M. C., Sririni, V., Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J. M. (2009b) Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles* 13: 321-331.
- Prosser, J. (2012) Ecosystem processes and interactions in a morass of diversity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81: 507-519.
- Prosser, J. I., Bohannon, B. J. M., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J. L., Green, L. E., Killham, K., Lennon, J. J., Osborn, A. M., Solan, M., van der Gast, C. J., Young, J. P. W. (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 384-392.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39-67.

- Sheridan, R. P., Ulik, T. (1976) Adaptive photosynthesis responses to temperature extremes by the thermophilic cyanophyte *Synechococcus lividus*. *J. Phycol.* 12: 255-261.
- Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G. O., Hjörleifsdottir, S., Marteinsson, V. T., Petursdottir, S. K., Holst, O., Kristjansson, J. K. (2000) Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2835-2841.
- Stetter, K. O., Fiala, G., Huber, G., Huber, R., Segerer, A. (1990) Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 117-124.
- Stott, M. B., Crowe, M. A., Mountain, B. W., Smirnova, A. V., Hou, S., Alam, M., Dunfield, P. F. (2008) Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environ. Microbiol.* 10: 2030-2041.
- Strimmer, K., von Haeseler, A. (1996) Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13: 964-969.
- Tamaki, H., Tanaka, Y., Matsuzawa, H., Maramatsu, M., Meng, X. Y., Hanada, S., Mori, K., Kamagata, Y. (2011) *Armatimonas rosea*, gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes*, phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1442-1447.
- Telford, R. J., Vandvik, V., Birks, H. J. B. (2006) Dispersal limitations matter for microbial morphospecies. *Science* 312: 1015.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix-choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- van der Meer, M. T. J., Schouten, S., de Leeuw, J. W., Ward, D. M. (2003) Compound-specific isotopic fractionation patterns suggest different carbon metabolism among Chloroflexus-like bacteria in hot-spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6000-6006.

- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C., Bateson, M. M. (1998) A natural view of microbial biodiversity hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1353-1370.
- Ward, D. M., Weller, R., Bateson, M. M. (1990) 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 105-116.
- Whitfield, J. (2005) Biogeography: is everything everywhere? *Science* 310: 960-961.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6578-6583.
- Wiegel, J. (1990) Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 155-170.
- Woodward, G., Dybkjær, J. B., Ólafsson, J. S., Gíslason, G. M., Hannesdóttir, E. R., Friberg, N. (2010) Sentinel systems on the razor's edge: effects of warming on Arctic geothermal stream ecosystems. *Glob. Change Biol.* 16: 1979-1991.
- Zimmermann, J., Gonzalez, J. M., Sáiz-Jiménez, C., Ludwig, W. (2005) Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured acidobacterial communities in Altamira Cave using 23S rRNA sequence analyses. *Geomicrobiol. J.* 22: 379-388.





### *Capítulo 3*

***Fervidobacterium thailandense* sp. nov.,  
un nuevo termófilo extremo aislado de  
una fuente termal al norte de Tailandia**

### 3.1. Resumen

La cepa FC2004<sup>T</sup> representa una bacteria termófila extrema, heterótrofa y estrictamente anaerobia aislada de una fuente termal en Tailandia. Las células típicas de la cepa FC2004<sup>T</sup> son bacilos (0,5-0,6 x 1,1-2,5 µm) con una membrana hinchada a modo de globo en un extremo (toga), aunque también forman estructuras en forma de filamentos (10-30 µm de longitud) y cuerpos redondeados o esferoides (3-8 µm-diámetro) formados por una membrana que engloba dos o más células en su interior. El rango de temperatura de crecimiento era de 60-88°C (temperatura óptima 78-80°C), el rango de pH de 6,5 a 8,5 (pH óptimo 7,5) y el rango de concentración de NaCl que permitía el crecimiento era de 0 a <5 g/l (concentración óptima 0,5 g/l). La adición de S<sup>0</sup> estimulaba el crecimiento mientras que el S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> y el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no influían. En cuanto a los hidratos de carbono, este microorganismo puede crecer utilizando glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa, celobiosa, carboximetilcelulosa y almidón. Su membrana está compuesta principalmente por los ácidos grasos saturados C<sub>16:0</sub> (71,6%) y C<sub>18:0</sub> (10,7%). El contenido en G+C era 45,8 mol%. La secuencia del gen ARNr 16S de la cepa FC2004<sup>T</sup> reveló una alta similitud con las especies del género *Fervidobacterium*: *F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (97-96%), *F. islandicum* AW-1 (96%), *F. changbaicum* CBS-1<sup>T</sup> (96%), *F. islandicum* H-21<sup>T</sup> (95%), *F. nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (95%), *F. riparium* 1445t<sup>T</sup> (95%) y *F. gondwanense* AB39<sup>T</sup> (93%). La secuencia del genoma de la cepa FC2004<sup>T</sup> mostró un tamaño de 2 Mbp y un total de 1858 CDSs, de las cuales, 39 correspondían con secuencias de inserción (IS). El análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S y el análisis ANI (Average Nucleotide Identity) sugieren que la cepa FC2004<sup>T</sup> podría tratarse de una nueva especie dentro del género *Fervidobacterium*, para la que se propone el nombre *Fervidobacterium thailandense*. La cepa tipo es FC2004<sup>T</sup> (JCM 18757<sup>T</sup> = ATCC BAA-2483<sup>T</sup>).

### 3.2. Introducción

La división Thermotogae comprende diversas bacterias mesófilas, termófilas e hipertermófilas estrictamente heterótrofas y anaerobias que se caracterizan por que todas poseen una estructura membranosa exterior característica a modo de vaina llamada toga. Recientemente, los miembros de esta división han sido reclasificados en 4 órdenes que contienen 5 familias: Thermotogales (Thermotogaceae y Fervidobacteriaceae), Kosmotogales (Kosmotogaceae), Petrotogales (Petrotogaceae) y Mesoaciditogales (Mesoaciditogaceae) (Reysenbach et al., 2013; Bhandari y Gupta, 2014; Itoh et al., 2016). Hasta la fecha, la división Thermotogae está descrita como no formadora de esporas, sin embargo, las células en fase estacionaria de *Pseudothermotoga subterranea* (o *Thermotoga subterranea*) así como *Thermotoga* sp. cepa PD524 se mostraron altamente resistentes a diversos agentes químicos y condiciones adversas (Jeanthon et al., 1995; Kanoksilapatham et al., 2015).

Los miembros del género *Fervidobacterium* (pertenecientes a la familia Fervidobacteriaceae) comparten ciertas características morfológicas comunes, ya que todos son bacilos cortos y rígidos que presentan una toga similar a un globo en uno de los extremos de la célula. Dentro del género *Fervidobacterium* se conocen seis especies, que incluyen *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (Patel et al., 1985), *F. islandicum* H-21<sup>T</sup> (Huber et al., 1990), *F. gondwanense* AB39<sup>T</sup> (Andrews y Patel, 1996), *F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (Friedruch y Antranikian, 1996), *F. islandicum* AW-1 (Nam et al., 2002) *F. changbaicum* CBS-1<sup>T</sup> (Cai et al., 2007) y *F. riparium* 1445t<sup>T</sup> (Podosokorskaya et al., 2011), las cuales han sido aisladas de diversas fuentes termales en distintas partes del mundo.

Recientemente, se han descubierto linajes de termófilos e hipertermófilos dentro de la división Thermotogae en fuentes termales del norte de Tailandia (Cuecas et al., 2014), incluyendo *Thermotoga* sp. cepa PD524 que se caracteriza porque

forma unas estructuras similares a un palo de golf (Kanoksilapatham et al., 2015). El objetivo de este estudio era caracterizar una nueva bacteria termófila aislada de una fuente termal al norte de Tailandia.

### 3.3. Materiales y métodos

Una muestra de sedimento procedente de una fuente termal (19° 57' 59,60" N, 99° 9' 21,53" E) situada en el Parque Nacional de Mae Fang, al norte de Tailandia, fue utilizada en el proceso de aislamiento. La temperatura en el sitio de muestreo era de 90°C.

El aislamiento lo llevamos a cabo en anaerobiosis a 80°C en medio 480G (Kanoksilapatham et al., 2015) con adición de 1% de azufre (peso/volumen; p/v). El medio 480G contenía (por litro): NaCl (0,5 g), NH<sub>4</sub>Cl (0,33 g), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,15 g), MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0,35 g), KCl (0,3 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,3 g), digerido pancreático de caseína (triptona) (1 g) (Criterion, CA, USA), extracto de levadura (0,5 g) (Criterion, CA, USA), solución A5 (1 ml), solución de resazurina (0,5 ml de una solución de 0,2 g/l) y 3 ml de la solución Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O [25% (p/v), pH 7]. El pH se ajustó a 7,2-7,5 usando NaOH 1N ó HCl 1N. La solución A5 (por litro) estaba compuesta por Co (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0,00494 g), CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (0,0079 g), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,286 g), MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (0,181 g), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,039 g) y ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,0222 g). Para obtener un cultivo puro de la cepa FC2004 utilizamos la técnica de dilución a extinción con tres repeticiones consecutivas.

Utilizando un microscopio de contraste de fase (Nikon eclipse 50i) y un microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope; SEM; CamScanMX-2000) visualizamos la morfología de las células de la cepa FC2004. Para la observación de estructuras de resistencia, un cultivo en fase

estacionaria fue teñido con el método de tinción de Schaeffer-Fulton, con ligeras modificaciones. Brevemente, el procedimiento consistió en suspender y fijar una pastilla de células en un volumen igual de glutaraldehído (10%) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células preservadas se extendieron sobre un portaobjetos realizando un frotis, seguido de secado y fijación por calentamiento. Para evitar la sequedad durante el procedimiento de tinción, un exceso de solución colorante verde malaquita cubría completamente el frotis y la tinción la realizamos dentro de una placa Petri con papel absorbente e incubándose a 80°C para facilitar la tinción. Después de 20 minutos de tinción, el exceso de colorante fue retirado a lo que siguió un lavado con agua destilada para decolorar las células vegetativas. Seguidamente, el protocolo consistía en añadir el colorante de contraste safranina sobre el frotis e incubarlo durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, el frotis era lavado con agua varias veces.

Para determinar el crecimiento de la cepa FC2004 en función de la temperatura, concentración de NaCl y pH utilizamos medio 480G (en botellas con 100 ml por triplicado). La abundancia inicial de células era  $10^5$  células/ml. Para determinar la velocidad de crecimiento, tomamos alícuotas (1 ml) a intervalos de tiempo apropiados (2-3 h) durante su fase exponencial y realizamos recuentos directos en un microscopio de contraste de fase. La velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó por regresión lineal durante la fase exponencial de crecimiento a partir de gráficas semilogarítmicas.

Para analizar la utilización de hidratos de carbono crecimos las células de la cepa FC2004 en un medio basal con adición de 0,1% (p/v) del carbohidrato en cuestión (por triplicado). La composición del medio basal era similar al medio 480G excepto que en este caso contenía 0,1 g/l digerido pancreático de caseína y 0,05 g/l extracto de levadura. Consideramos el ensayo como positivo cuando la

abundancia alcanza un valor de al menos el doble al observado en el medio basal (control).

El efecto del  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  y el  $\text{NO}_3^-$  (20 mM, concentración final) sobre el crecimiento en medio 480G lo analizamos como se ha descrito previamente (Kanoksilapatham 2015). Estudiamos el efecto del  $\text{S}^0$  sobre el crecimiento en medio 480G con 1% de  $\text{S}^0$  (p/v). Un inóculo de la cepa FC2004 con una concentración de  $10^5$  células/ml fue inoculada en medio 480G (control) y en dos réplicas de medio 480G con 1% de  $\text{S}^0$ . Las alícuotas tomadas a las 24, 48 y 72 horas durante la incubación realizada a  $80^\circ\text{C}$  sirvieron para estimar el crecimiento. El nivel de significación del aumento del crecimiento se analizó mediante ANOVA de un solo factor y LSD (Least Significant Difference). Durante estas incubaciones determinamos si se producía sulfuro a partir de muestras tomadas antes y después de la incubación por el método de azul de metileno (Askew y Smith, 2005).

La capacidad para hidrolizar queratina fue determinada a partir de la degradación de plumas a  $80^\circ\text{C}$  en medio I-medium modificado (Friedrich y Antranikian, 1996). La solución de elementos traza y la de vitaminas en este medio modificado fue sustituida por NaCl, (0,3 g/l) y solución A5, (1 ml/l). Un primer paso consistió en la incubación de un inóculo de la cepa FC2004 en medio 480G durante la noche hasta conseguir un cultivo con aproximadamente  $10^5$  células/ml. Posteriormente, un inóculo de este cultivo fue transferido al medio descrito modificado que contenía plumas.

Para purificar ADN de la cepa FC2004 utilizamos el Master kit “MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit” (Epicenter, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). La estimación del contenido G+C del genoma se realizó tanto por el método de desnaturalización térmica (Marmur y Doty, 1962) como a partir de la secuencia preliminar de su genoma (Número de acceso LWAF01000000) que

realizamos en un pirosecuenciador GS FLX (Roche, Basilea, Suiza). A partir de esta secuencia preliminar del genoma, obtuvimos el gen ARNr 16S. Construimos un árbol filogenético basado en genes ARNr 16S utilizando el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). El análisis ANI (Average Nucleotide Identity) realizado con la herramienta “ANI calculator” (<http://www.enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) según Goris et al. (2007) sirvió para evaluar el grado de similitud entre pares de genomas dentro del género *Fervidobacterium*.

Utilizando el sistema Sherlock MIS (Microbial Identification System; Microbial IDentification Inc., MIDI, Newark, Delaware, Estados Unidos) (Sasser, 1990) a partir de células de un cultivo en medio 480G (80°C), aproximadamente en la mitad de la fase exponencial de crecimiento determinamos la composición de ácidos grasos en la membrana de la cepa FC2004. Esta determinación la realizó la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Paterna, Valencia, España).

Para evaluar los ácidos orgánicos liberados al medio de cultivo durante el crecimiento de la cepa FC2004 en medio de 480G, estos fueron transformados en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES; Fatty Acid Methyl Esters) mediante una reacción de transesterificación usando metóxido de sodio (0,5% en metanol). Estos FAMES fueron analizados mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 Serie II (Hewlett-Packard, Avondale, Estados Unidos) equipado con un detector de ionización de llama. La separación se llevó a cabo en una columna SGE BPX70 (10 m de longitud; diámetro interno de 0,1 mm; 0,2 µm de tamaño de partícula) usando el H<sub>2</sub> como gas portador. Las temperaturas del inyector y del detector eran de 250°C y 270°C y se estableció un gradiente de temperatura de 50°C a 250°C durante 45 minutos. Comparando los tiempos de retención con estándares conocidos identificamos los FAMES en los cultivos analizados. Este análisis lo realizó el Dr. Sánchez Perona (Instituto de la Grasa, CSIC, Sevilla, España).

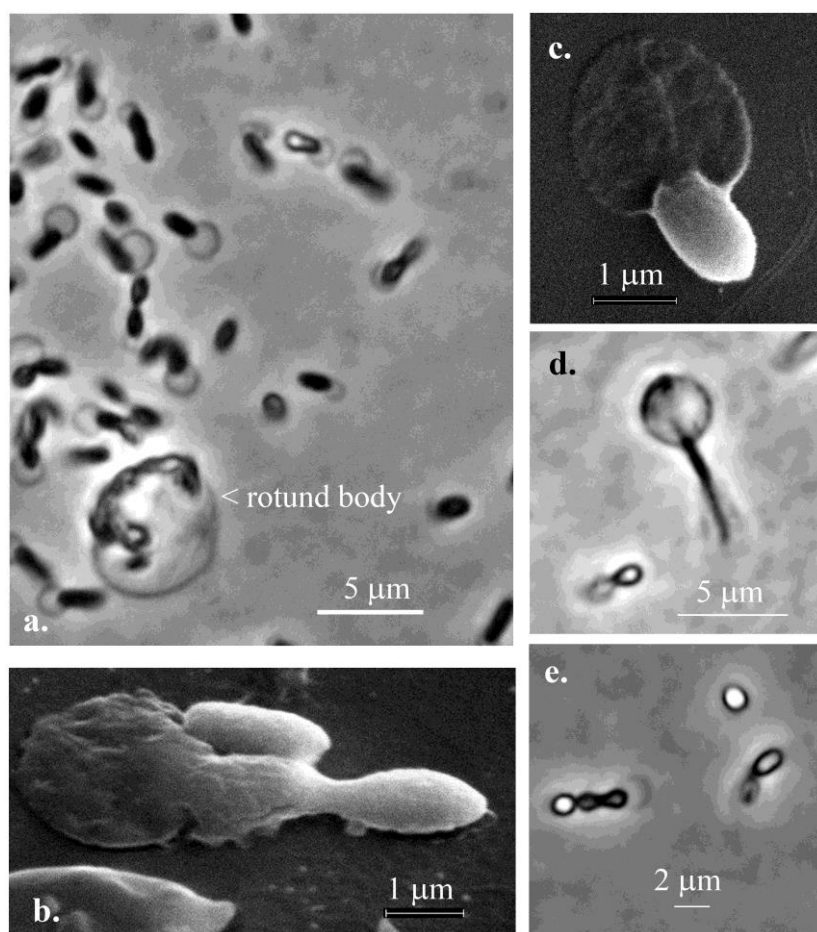
### 3.4. Resultados y discusión

Las células de la cepa FC2004 presentaban una morfología tipo bacilo encapsulado por una membrana externa, “toga”, que formaba una estructura en forma de globo en uno de los extremos (Figura 3.1a). Las dimensiones de los bacilos variaba en el rango 0,5-0,6 x 1,1-2,5  $\mu\text{m}$ . Se identificaron dos formas diferentes de bacilos, en forma de balón de rugby y en forma de barril, ambos presentando el esferoide terminal (Figura 3.1b, c). También se detectaron filamentos celulares (10-30  $\mu\text{m}$  de longitud) (Figura 3.1d) y cuerpos redondeados o esferoides (diámetro de 3 a  $>8$   $\mu\text{m}$ ) delimitados por una membrana que podían contener hasta más de 10 células en su interior (Figura 3.1a). Por otro lado, bajo el microscopio de contraste de fase, observamos un cuerpo ovoide refringente envuelto por una capa gruesa (Figura 3.1e), al que hemos llamado “estructura refringente”, en el centro de determinadas células en fase estacionaria. Estas estructuras se detectaron gracias a la tinción de células en fase estacionaria con el colorante verde malaquita utilizando el método de tinción de Schaeffer-Fulton (Figura 3.2) lo que recuerda a la existencia de esporas.

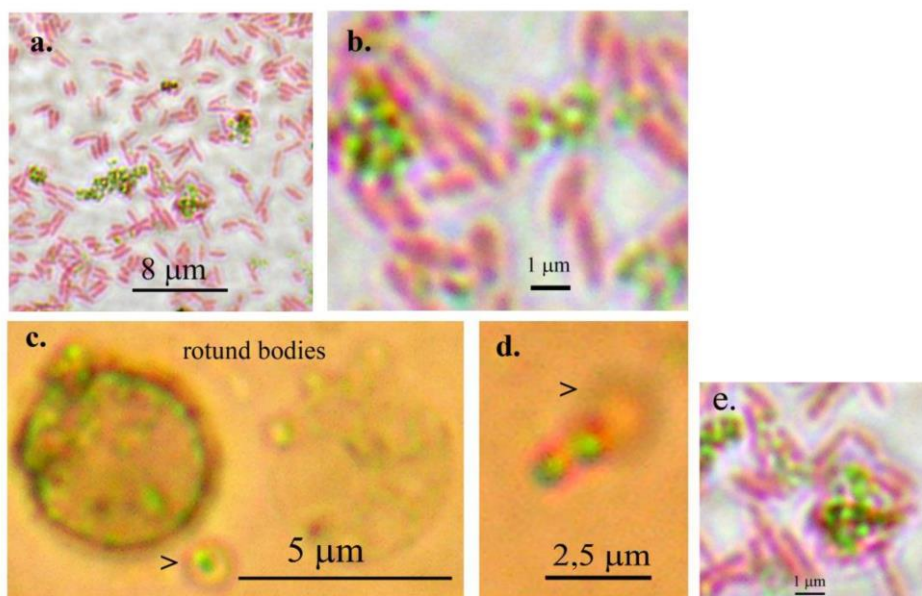
El rango de temperatura para el crecimiento de la cepa FC2004 era de 60°C a 88°C (temperatura óptima: 78-80°C), el rango de pH estaba entre 6,5 y 8,5 (pH óptimo: 7,5) y el rango de concentración de NaCl era  $<5\text{g/l}$  (concentración óptima: 0,5 g/l). No se detectó crecimiento a 90°C (Figura 3.3) y, a diferencia de otras especies relacionadas, la cepa FC2004 no crecía a temperaturas por debajo de 55°C (Tabla 3.1). La velocidad de crecimiento en condiciones óptimas era 0,49  $\text{h}^{-1}$ .

La cepa FC2004 era capaz de crecer con glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa, celobiosa, carboximetilcelulosa (CMC) y almidón. No se detectó crecimiento con lactosa, galactosa, trehalosa, arabinosa, manosa, xilosa, sorbitol, manitol y

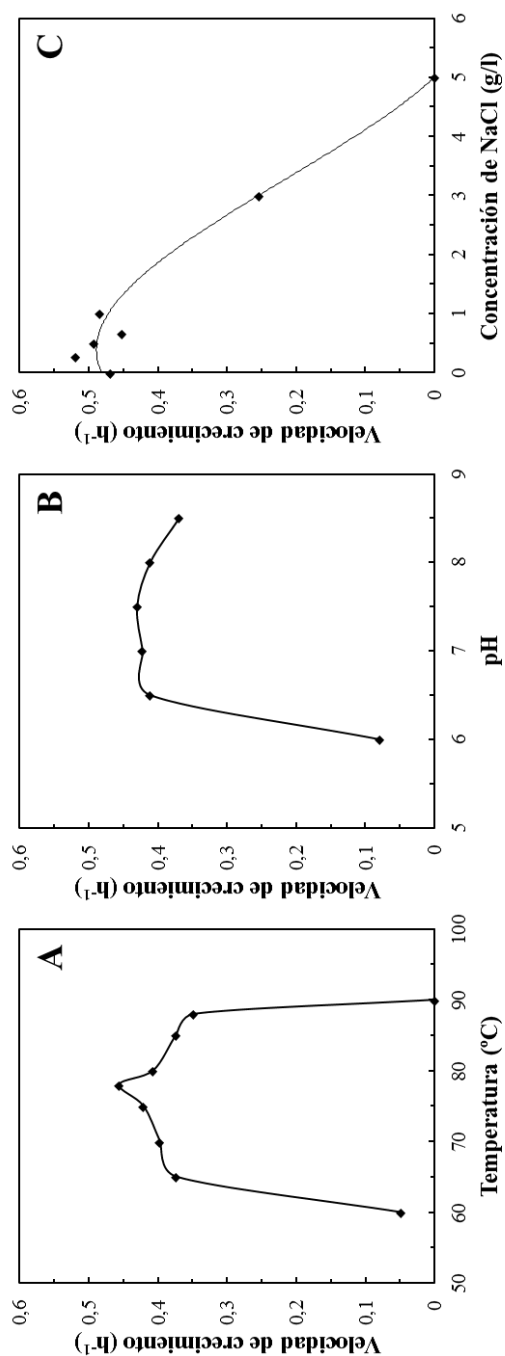




**Figura 3.1.** Morfología de la cepa FC2004<sup>T</sup>. **a**, Microfotografía en contraste de fase mostrando las células con forma típica de bacilo, con una toga esférica en el extremo. La flecha señala un cuerpo redondeado o esferoide (“rotund body”). **b**, Microfotografía por SEM mostrando una célula en forma de balón de rugby con una gran toga terminal en forma de saco. **c**, Microfotografía por SEM mostrando una célula en forma de barril con una toga terminal similar a un globo. **d**, Microfotografía en contraste de fase mostrando un filamento con una estructura terminal similar a un globo. **e**, Microfotografía en contraste de fase mostrando células con forma de bacilo con una estructura refringente. En cada fotografía se indica la barra de escala.



**Figura 3.2.** Células de la cepa FC2004<sup>T</sup> en fase estacionaria teñidas con el método de tinción Schaeffer-Fulton, usando el colorante verde malaquita. Las imágenes **a**, **b**, y **e** muestran células vegetativas con forma de bacilo y agregados de células ovales de color verde (0,4-0,5 x 0,6-0,8 µm). **c**, cuerpos redondeados o esferoides (“rotund bodies”) conteniendo células ovales verdes en su interior y una célula verde encapsulada en una membrana externa. **d**, dos células emparejadas teñidas de verde malaquita rodeadas por una estructura membranosa externa tipo vaina. La punta de flecha indica la membrana esferoide terminal en un extremo (c y d).



**Figura 3.3.** Influencia de la temperatura (A), pH (B) y concentración de NaCl (C) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa FC2004<sup>T</sup>.

**Tabla 3.1.** Características de la cepa FC2004<sup>T</sup> y de las cepas tipo de las especies del género *Fervidobacterium*.

Organismos	1 FC2004 <sup>T</sup>	2 Rt17-B1 <sup>T</sup>	3 H21 <sup>T</sup>	4 AB39 <sup>T</sup>	5 DSM 9078 <sup>T</sup>	6 CBS-1 <sup>T</sup>	7 1445t <sup>T</sup>
<b>Hábitat</b>	Mae Fang, Tailandia	Nueva Zelanda	Islandia	Australia	Islas Azores, Portugal	China	Islas Kunashir, Russia
<b>Tamaño celular (µm)</b>	0,5-0,6 x 1,1-30,0	0,5 x 1,0-2,5	0,6 x 1,0-4,0	0,5-0,6 x 4,0-40	0,5 x 2,0-20,0	0,5-0,6 x 1,0-8,0	0,4-0,5 x 1,0-3,0
<b>Rango de T<sup>a</sup> (óptimo) (°C)</b>	60-88 (78-80)	47-80 (70)	50-80 (65)	>45-<80 (65-68)	50-80 (70)	55-90 (75-80)	46-80 (65)
<b>Rango de pH (óptimo)</b>	6,0-8,5 (7,5-8)	6,0-8,0 (7,0)	6,0-8,0 (7,2)	6,0-8,0 (7,0)	5,5-8,0 (6,5)	6,3-8,5 (7,5)	5,7-9,0 (7,8)
<b>Rango de NaCl (óptimo) (g/l)</b>	0 - <5 (0-1,0)	<10 (nc)	<10 (2,0)	0-6 (1,0)	0-40 (4,0)	0-10 (0,0)	0-10 (0,0)
<b>Tiempo de generación (min.)</b>	85	105	150	79	126	99	55
<b>Utilización de:</b>							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	nc	nc	nc	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	+	- <sup>b</sup>	+	-	+	-
Fructosa	+	+	+ <sup>b</sup>	+	+	+	+
Xilosa	-	-	- <sup>b</sup>	+	+	-	+
Arabinosa	-	±	+ <sup>b</sup>	-	-	-	-
Galactosa	-	+	+ <sup>b</sup>	±	+ <sup>b</sup>	+	nc
Manosa	-	+	+ <sup>b</sup>	+	+ <sup>b</sup>	-	nc
Sorbitol	-	+	nc	nc	nc	+	nc
Manitol	-	nc	nc	nc	nc	-	nc
Trehalosa	-	nc	nc	nc	nc	+	nc
Almidón	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	nc	nc	+	nc	+	+
CMC	+	nc	nc	±	nc	nc	+
Celulosa	-	-	+	-	- <sup>b</sup>	-	+
<b>Degradación de pluma</b>	+	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	+	nc	nc
<b>Contenido G+C (mol%)</b>	45,8 <sup>a</sup>	33,7	41,0	35,0	40,0	31,9	31,0

Organismos: 1, *Fervidobacterium thailandense* FC2004<sup>T</sup> (este estudio); 2, *F. nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (Patel et al., 1985); 3, *F. islandicum* H21<sup>T</sup> (Huber et al., 1990); 4, *F. gondwanense* AB39<sup>T</sup> (Andrews y Patel, 1996); 5, *F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (Friedrich y Antranikian, 1996); 6, *F. changbaicum* CBS-1<sup>T</sup> (Cai et al., 2007); 7, *F. riparium* 1445t<sup>T</sup> (Podosokorskaya et al., 2011).

+, positivo; -, negativo; ±, moderado; nc, no citado;

<sup>a</sup> Calculado a partir de la secuencia preliminar del genoma (número de acceso LWAF01000000).

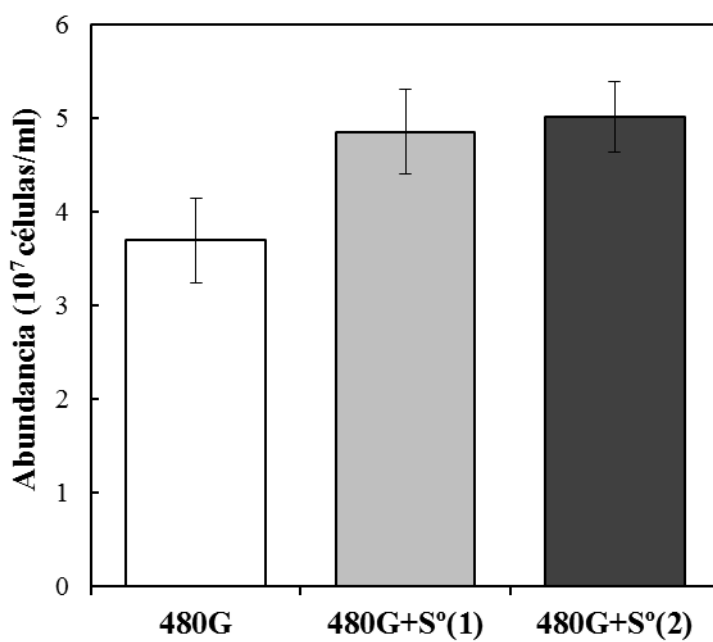
<sup>b</sup> Datos tomados de Nam et al. (2002).

celulosa (Tabla 3.1). Al igual que las otras especies descritas dentro del género, la cepa FC2004 fermentaba glucosa, maltosa y fructosa. A diferencia de *F. islandicum* H21<sup>T</sup> y *F. riparium* 1445t<sup>T</sup>, la cepa FC2004 no utiliza celulosa. Sin embargo, la cepa FC2004 metabolizaba carboximetilcelulosa. La velocidad de crecimiento de la cepa FC2004 ( $3,7 \cdot 10^7 \pm 4,3 \cdot 10^6$  células/ml en medio 480G) incrementaba en medio 480G suplementado con S<sup>o</sup> ( $2,5 \cdot 10^8 \pm 1,9 \times 10^7$  células/ml) (Figura 3.4). La adición de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> ( $3,7 \cdot 10^7 \pm 3,2 \cdot 10^6$  células/ml) y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $3,9 \cdot 10^7 \pm 2,6 \cdot 10^6$  células/ml) no influía en la velocidad de crecimiento. Tanto en medio 480G con y sin S<sup>o</sup> añadido detectamos producción de sulfuro. La cepa FC2004 presentaba la capacidad de degradar plumas (Figura 3.5). Este fenotipo es similar al observado en *F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> y *F. islandicum* AW-1 (Friedrich y Antranikian, 1996; Nam et al., 2002).

En la composición de ácidos grasos en la membrana celular de la cepa FC2004 destacaban los ácidos grasos C<sub>12:0</sub> (2,8%), C<sub>14:0</sub> (7,2%), C<sub>16:0</sub> (71,6%) y C<sub>18:0</sub> (10,7%) y pequeñas cantidades de los ácidos grasos insaturados C<sub>16:1</sub> (0,4%) y C<sub>18:1</sub> (2,4%). Aproximadamente un 2,4% correspondía a ácidos grasos de cadena ramificada, incluyendo iso-C<sub>15:0</sub> (0,3%), iso-C<sub>16:0</sub> (0,8%), iso-C<sub>17:0</sub> (0,3%), anteiso-C<sub>17:0</sub> (0,3%) y iso-C<sub>18:0</sub> (0,7%) más una pequeña cantidad de ácidos grasos de cadena corta (1,3% de C<sub>9:0</sub> y C<sub>10:0</sub>) (Tabla 3.2).

Los ácidos orgánicos liberados al medio de cultivo por la cepa FC2004 durante la fase exponencial de crecimiento en medio 480G a 80°C eran de 5, 9, 10, 11 y 12 átomos de carbono.

El contenido G+C del genoma estimado mediante desnaturalización térmica (44,0 mol%) era coherente con el valor de 45,8 mol% calculado a partir de la secuencia preliminar del genoma. El gen ARNr 16S de la cepa FC2004 mostraba similitud con especies del género *Fervidobacterium*: *F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (97-96%), *F. islandicum* AW-1 (96%), *F. changbaicum* CBS-1<sup>T</sup> (96%), *F.*



**Figura 3.4.** Efecto del S° sobre el crecimiento de la cepa FC2004<sup>T</sup>. Se muestran resultados obtenidos en el control y dos réplicas tras 48 horas de incubación. Las barras de error indican la desviación estándar (n=3).



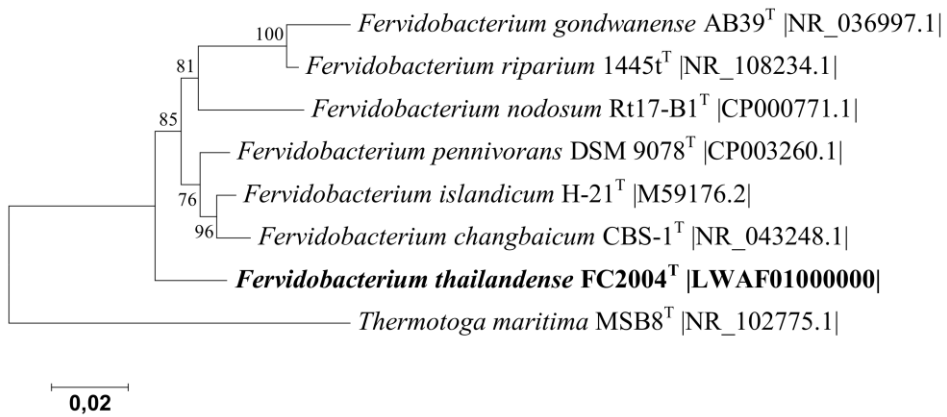
**Figura 3.5.** Visualización de la hidrólisis de queratina determinada a partir de la capacidad de degradar plumas. La imagen de la izquierda muestra un cultivo positivo a las 48 horas. La imagen de la derecha muestra el control sin inocular bajo las mismas condiciones de incubación.

**Tabla 3.2.** Composición de ácidos grasos en la cepa FC2004<sup>T</sup> y otras cepas de especies relacionadas. Los datos muestran porcentajes del total sólo para aquellos ácidos grasos que representaban más del 1%.

Ácido Graso	Cepas				
	1	2	3	4	5
C <sub>12:0</sub>	2,8	-	-	-	-
C <sub>14:0</sub>	7,2	-	11,0	10,6	1,0
C <sub>15:0</sub>	-	-	-	1,7	-
C <sub>16:0</sub>	71,6	52,2	46,7	81,8	77,4
C <sub>17:0</sub>	-	-	1,5	1,2	-
C <sub>18:0</sub>	10,7	6,4	19,2	2,5	8,6
C <sub>13:0</sub> iso-3OH	-	2,5	-	-	-
C <sub>13:0</sub> 3OH	-	1,3	-	-	-
C <sub>13:0</sub> iso	-	-	1,4	-	-
C <sub>14:0</sub> iso	-	11,7	-	-	-
C <sub>15:0</sub> iso	-	1,2	6,7	-	-
C <sub>15:1</sub> iso-F	-	2,1	-	-	-
C <sub>15:0</sub> anteiso	-	1,3	-	-	-
C <sub>16:0</sub> iso	-	2,7	-	-	-
C <sub>16:1</sub> ω7c	-	2,0	-	-	-
C <sub>16:1</sub> ω9c	-	-	2,1	-	-
C <sub>17:0</sub> iso	-	1,1	-	-	-
C <sub>17:0</sub> anteiso	-	1,2	-	-	-
C <sub>18:2</sub> ω6,9c	-	1,3	-	-	-
C <sub>18:1</sub> ω5c	-	1,0	-	-	-
C <sub>18:1</sub> ω7c	-	2,7	-	-	3,9
C <sub>18:1</sub> ω9c	1,5	4,5	3,5	-	2,3
Otros (<1%)	6,2	4,8	7,9	2,2	6,8

Cepas: 1, *Fervidobacterium thailandense* cepa FC2004<sup>T</sup> (este estudio); 2, *F. changbaicum* cepa CBS-1<sup>T</sup>; 3, *F. gondwanense* cepa AB39<sup>T</sup>; 4, *F. islandicum* cepa H21<sup>T</sup>; 5, *F. nodosum* cepa Rt17-B1<sup>T</sup>.





**Figura 3.6.** Árbol filogenético, obtenido con el método “Neighbor joining”, de las secuencias del gen ARNr 16S de la familia Fervidobacteriaceae mostrando la relación de la cepa FC2004<sup>T</sup> con las seis especies descritas del género *Fervidobacterium*. El gen ARNr 16S de *Thermotoga maritima* MCB8<sup>T</sup> se empleó como referencia (“outgroup”). Los valores de bootstrap presentados como porcentajes corresponden a 1000 iteraciones.

**Tabla 3.3.** Resultado del análisis ANI para la cepa FC2004<sup>T</sup> (LWAF01000000), *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (NC\_009718), *F. pennivorans* DSM 9078<sup>T</sup> (NC\_017095) y *F. islandicum* AW-1 (CP014334.1).

	Cepa FC2004 <sup>T</sup> (%ANI ± SD%)	<i>F. nodosum</i> Rt17-B1 <sup>T</sup> (%ANI ± SD%)	<i>F. pennivorans</i> DSM 9078 <sup>T</sup> (%ANI ± SD%)
Cepa FC2004 <sup>T</sup> (LWAF01000000)			
<i>F. nodosum</i> Rt17-B1 <sup>T</sup> (NC_009718)	78,24 ± 7,75		
<i>F. pennivorans</i> DSM 9078 <sup>T</sup> (NC_017095)	79,03 ± 8,78	82,35 ± 10,28	
<i>F. islandicum</i> AW-1 (CP014334.1)	78,88 ± 8,07	83,68 ± 10,71	82,10 ± 8,35

**Tabla 3.4.** Características básicas comparativas de los genomas de *Fervidobacterium*.

Característica	<i>F. nodosum</i> Rt17-B1	<i>F. pennivorans</i> DSM 9078	<i>F. islandicum</i> H21	<i>F. thailandense</i> FC2004
Nº de acceso	NC_009718	NC_017095	NZ_CP014334	NZ_LWAF00000000
Longitud del genoma (Mbp)	1,95	2,17	2,24	2,04
Coding Sequences (CDS)	1770	1930	1929	1858
Contigs	1	1	12	55
Contenido en G+C (%)	35,0	38,8	40,7	45,8
ARNs ribosomales	16s (2); 5s (2); 23s (2); total=6	16S (2); 5s (3); 23s (2); total=7	16s (2); 5s (2); 23s (2); total=6	16s (3); 5s (1); 23s (1); total=5
ARNs de transferencia	50	48	47	46
Secuencias de inserción	43	41	43	39
Fuente	Zhaxybayeva et al. 2009	DOE-JGI NCBI	Lee et al. 2015	Este estudio

*islandicum* H-21<sup>T</sup> (95%), *F. nodosum* Rt17-B1<sup>T</sup> (95%), *F. riparium* 1445t<sup>T</sup> (95%) y *F. gondwanense* AB39<sup>T</sup> (93%). El análisis filogenético sugería la posición de la cepa FC2004 como la rama más ancestral conocida dentro del género (Figura 3.6). El análisis ANI entre la cepa FC2004 y las especies del género *Fervidobacterium* mostraba porcentajes muy por debajo del umbral establecido para una misma especie (95%) (Goris et al., 2007): *F. nodosum* (78,24%, SD 7,75%), *F. pennivorans* (79,03%, SD 8,78%) y *F. islandicum* (78.88%, SD 8,87%) (Tabla 3.3).

El ensamblado del genoma ha dado lugar a 55 contigs. El genoma de la cepa FC2004 muestra un tamaño similar al resto de los genomas de *Fervidobacterium*, alrededor de 2 Mbp, y un número de secuencias codificantes equivalentes, ligeramente menor a 2000 por genoma. En general, las especies de *Fervidobacterium* suelen contener 2 copias del gen ARNr 16S prácticamente idénticas y un número identificado de ARNt entre 46-50. Es de destacar la presencia de 39 secuencias de inserción (ISs) en el genoma de la cepa FC2004, cuyo número es parecido al detectado en los otros genomas. Esta abundancia de secuencias de inserción sugiere interés en fenómenos de movimientos de fragmentos de ADN y, en definitiva, en conferir plasticidad a estos genomas.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la cepa FC2004 corresponde a una nueva especie dentro del género *Fervidobacterium*, para la cual se propone el nombre de *Fervidobacterium thailandense*.

### **3.5. Descripción de *Fervidobacterium thailandense* sp. nov.**

*Fervidobacterium thailandense* (thai.land.en'se. N. L. neut. adj. *thailandense*, relativo a Tailandia, el país donde se aisló la cepa tipo).

Las células de la cepa FC2004<sup>T</sup> consisten en bacilos, bien en forma de balón de rugby o de barril (0,5-0,6 x 1,1-2,5 µm) con una membrana externa tipo vaina, “toga”, que forma una estructura en forma de globo sobre un extremo de la célula. También forma estructuras a modo de filamentos (10-30 µm de largo) y cuerpos redondeados o esferoides (diámetro de 3 a 8 µm). La cepa FC2004<sup>T</sup> produce una estructura refringente (por microscopía de contraste de fase) que aparece como un cuerpo ovoide brillante rodeado por una capa gruesa en posición central. Estas estructuras pueden ser observadas en cultivos en fase estacionaria, como células de forma ovoide cuando son teñidas con colorante verde malaquita. La cepa FC2004<sup>T</sup> representa bacterias termófilas extremas que crecen entre 60°C y 88°C (óptimo de 80°C), a pH de 6,0 a 8,5 (óptimo de 7,5) y a concentración de NaCl de 0 a <5 g/l (óptimo de 0,5 g/l). Son anaerobias estrictas organotrofas que fermentan proteínas y varios carbohidratos incluyendo glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa, celobiosa, carboximetilcelulosa y almidón. Sin embargo, la cepa FC2004<sup>T</sup> no fermenta lactosa, galactosa, trehalosa, arabinosa, manosa, xilosa, sorbitol, manitol o celulosa. El azufre elemental estimula el crecimiento de estas bacterias mientras que el tiosulfato y el nitrato no tienen efecto sobre el crecimiento. El contenido de G+C del genoma es de 45,8 mol%. El genoma presenta un tamaño alrededor de 2 Mbp y un total de 1858 CDSs, de las cuales, 39 correspondían con secuencias de inserción (IS). La cepa tipo FC2004<sup>T</sup> (JCM18757 o ATCC BAA-2483) se aisló de sedimento procedente de una fuente termal en el norte de Tailandia.

### 3.6. Bibliografía

- Andrews, K. T., Patel, B. K. C. (1996) *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 265-269.
- Askew, E. F., Smith, R.-K. (2005) Inorganic nonmetallic constituents. In: Eaton, A. D., Clesceri, L. S. Rice, E. W., Greenberg, A. E. (eds.) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Cadmus Professional Communications, Linthicum, M. D., U. S. A.
- Bhandari, V., Gupta, R. S. (2014) Molecular signatures for the phylum (class) Thermotogae and a proposal for its division into three orders (Thermotogales, Kosmotogales ord. nov. and Petrotogales ord. nov.) containing four families (Thermotogaceae, Fervidobacteriaceae fam. nov., Kosmotogaceae fam. nov. and Petrotogaceae fam. nov.) and a new genus *Pseudothermotoga* gen. nov. with five new combinations. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 105: 143-168.
- Cai, J., Wang, Y., Liu, D., Zeng, Y., Xue, Y. (2007) *Fervidobacterium changbaicum* sp. nov., a novel thermophilic anaerobic bacterium isolated from a hot spring of the Changbai Mountains, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2333-2336.
- Cuecas, A., Portillo, M. C., Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J. M. (2014) Bacterial distribution along a 50 °C temperature gradient reveals a parceled out hot spring environment. *Microb. Ecol.* 68: 729-739.
- Friedrich, A. B., Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2875-2882.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship

- to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 81-91.
- Huber, R., Woese, C. R., Langworthy, T. A., Kristjansson, J. K., Stetter, K. O. (1990) *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the “Thermotogales”. *Arch. Microbiol.* 154: 105-111.
- Itoh, T., Onishi, M., Kato, S., Iino, T., Sakamoto, M., Kudo, T., Takashina, T., Ohkuma, M. (2016) *Athalassotoga saccharophila* gen. nov. sp. nov. isolated from an acidic terrestrial hot spring of Japan, and proposal of Mesoaciditogales ord. nov., Mesoaciditogaceae fam. nov. in the phylum Thermotogae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 1045-1051.
- Jeanthon, C., Reysenbach, A. L., L'Haridon, S., Gambacorta, A., Pace, N. R., Glénat, P., Prieur, D. (1995) *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. *Arch. Microbiol.* 164: 91-97.
- Kanoksilapatham, W., Keawram, P., Gonzalez, J. M., Robb, F. T. (2015) Isolation, characterization, and survival strategies of *Thermotoga* sp. strain PD524, a hyperthermophile from a hot spring in Northern Thailand. *Extremophiles* 19: 853-861.
- Marmur, J., Doty, P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5: 109-118.
- Nam, G. W., Lee, D. W., Lee, H. S., Lee, N. J., Kim, B. C., Choe, E. A., Hwang, J. K., Suhartono, M. T., Pyun, Y. R. (2002) Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 178: 538-547.
- Patel, B. K. C., Morgan, H. W., Daniel, R. M. (1985) *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 141: 63-69.

- Podosokorskaya, O. A., Merkel, A. Y., Kolganova, T. V., Chernyh, N. A., Miroshnichenko, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Kublanov, I. V. (2011) *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2697-2701.
- Reysenbach, A. L., Liu, Y., Lindgren, A. R., Wagner, I. D., Sislak, C. D., Mets, A., Schouten, S. (2013) *Mesoaciditoga lauensis* gen. nov., sp. nov., a moderately thermoacidophilic member of the order Thermotogales from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 4724-4729.
- Sasser, M. (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC Newsl* 20: 1-6.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) The CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.



## *Capítulo 4*

# **Análisis de transferencia horizontal en el género *Fervidobacterium* mediante análisis comparativo de los genes que codifican transposasas**

## 4.1. Resumen

La transferencia horizontal de genes (HGT; Horizontal Gene Transfer) desempeña un papel importante en la fisiología y evolución de los microorganismos, especialmente en los termófilos. Algunos miembros de la división Thermotogae (por ejemplo, *Thermotoga* spp.) presentan genomas constituidos por un mosaico de genes de orígenes muy diversos. Este estudio presenta un nuevo enfoque para estudiar la posible plasticidad de los genomas del género *Fervidobacterium* utilizando los genes que codifican transposasas y sus secuencias de inserción como objeto de análisis. Las transposasas son proteínas claves que participan en reordenamientos del ADN en los genomas. Los análisis comparativos realizados incluyen filogenia, análisis multivariable de frecuencias de tetranucleótidos y cuantificación de la divergencia de los genes que codifican transposasas, así como la comparación de los extremos repetitivos de las secuencias de inserción, utilizando los datos de cuatro genomas de *Fervidobacterium*: *F. nodosum*, *F. pennivorans*, *F. islandicum* y una nueva especie, *Fervidobacterium thailandense* FC2004. Atendiendo a su grado de similitud, las secuencias de genes que codifican transposasas pueden clasificarse en diferentes grupos. Los distintos métodos utilizados en este estudio indicaban que más de la mitad de los grupos de secuencias analizadas representaban posibles casos de HGT con miembros de la división Firmicutes, siendo *Caldicellulosiruptor* el género cuyas secuencias mostraban mayor proximidad. Ello implica la posibilidad de compartir secuencias y capacidades funcionales que les permitan prosperar bajo condiciones ambientales similares. Los genes que codifican transposasas representan secuencias idóneas para analizar la plasticidad genotípica y explicar el mosaico génico que constituyen muchos genomas bacterianos.

## **4.2. Introducción**

El mundo microbiano presenta una enorme diversidad (Curtis et al., 2002; Keller y Zengler, 2004). Los hábitats naturales contienen comunidades microbianas complejas donde diferentes microorganismos interactúan con el medio ambiente. Esta constante interacción resulta en una elevada presión adaptativa a las condiciones existentes. Las células microbianas viven en comunidades y están continuamente interactuando con células de su misma especie o de especies diferentes (West et al., 2007). Este escenario interactivo genera oportunidades para el intercambio de capacidades funcionales y acelerar así el ritmo de una adaptación evolutiva.

La transferencia horizontal de genes (HGT; Horizontal Gene Transfer) consiste en el intercambio de ADN entre especies. Este fenómeno resulta de mayor interés cuando se produce entre células filogenéticamente distantes, por ejemplo, entre diferentes divisiones. La HGT es muy frecuente en el mundo procariota y parece presentar gran importancia en la evolución de los microorganismos (Lorenz y Wakernagel, 1994; Ochman et al., 2000; Boto, 2010). Sin embargo, los mecanismos por los que se producen estos procesos son prácticamente desconocidos. Los estudios filogenéticos proporcionan una valiosa información sobre posibles eventos de movilidad de ADN a lo largo de la evolución microbiana. En este sentido, la participación de elementos genéticos móviles (MGE; Mobile Genetic Elements) es un factor de gran importancia en la evolución de los microorganismos procariotas (Ochman et al., 2000; Frost et al., 2005).

La actividad de los diferentes MGE, ya sea dentro de un mismo genoma o entre genomas de microorganismos diferentes, tienen grandes implicaciones sobre la estructura y la función de los genomas. Por ejemplo, los MGE son capaces de

producir transposiciones de fragmentos de ADN y como consecuencia, dar lugar a la inactivación/activación de genes o incluso provocar la inserción o delección de genes completos (Siguier et al., 2014). Entre los elementos móviles, las secuencias de inserción (Insertion Sequence; IS) se consideran los elementos de transposición autónoma más simples. Estas ISs están constituidas por un gen que codifica una transposasa flanqueado, generalmente, por secuencias repetitivas en sus dos extremos. En consecuencia, se espera que los genes que codifican transposasas experimenten reorganizaciones en el genoma con más frecuencia que otros genes (Wagner, 2006).

El mecanismo de acción de las transposasas facilita el movimiento de los elementos de transposición a una ubicación diferente a la inicial, bien mediante mecanismos replicativos (conservando la ubicación inicial) o no replicativos. Como resultado de ello, la disrupción de genes causada por la escisión de una IS y su inserción en otra zona del genoma, u otro genoma distinto, son aspectos que pueden analizarse para hacer un seguimiento de su origen y comprender la relevancia evolutiva de estos fenómenos (Snyder y Champness, 2007). Las secuencias repetitivas (Inverted Repeat; IR) que flanquean los genes que codifican transposasas generalmente van incluidas en el ADN transpuesto. La participación de las transposasas en la movilidad del ADN dentro de un genoma e incluso entre genomas (Ochman et al., 2000; Frost et al., 2005) sugiere que esos genes se pueden utilizar como modelo de estudio para comprender el potencial de los fenómenos de HGT en la evolución y plasticidad de los genomas bacterianos.

Las condiciones extremas, como las altas temperaturas, representan ambientes que favorecen el desarrollo de mecanismos de adaptación. Los eventos de HGT representan un mecanismo importante que facilita la adaptación de los microorganismos a estos ambientes (Aravind et al., 1998; van Wolferen et al., 2013; Zhaxybayeva et al., 2009). Por ejemplo, la división *Thermotogae*,

representada mayoritariamente por termófilos, constituye un grupo que ha experimentado numerosos fenómenos de HGT, especialmente con miembros de la división Firmicutes y el dominio Archaea. Este punto ha sido investigado con el genoma de *Thermotoga maritima* (Nelson et al., 1999; Ochman et al., 2000) y otros genomas de los géneros *Thermotoga* y *Thermosipho* y la especie *Fervidobacterium nodosum* (Nesbø et al., 2009; Zhaxybayeva et al., 2009).

Este estudio evalúa la posibilidad de deducir eventos de HGT a partir del análisis de los genes que codifican transposasas en genomas del género *Fervidobacterium* y conocer la relación de sus genomas con distintos taxones tanto cercanos como distantes.

### 4.3. Materiales y Métodos

#### 4.3.1. Genomas, genes y análisis filogenéticos

Los genomas del género *Fervidobacterium* utilizados en este estudio fueron el genoma de *F. nodosum* (NC\_009718) (Patel et al., 1985; Zhaxybayeva et al., 2009), el genoma de *F. pennivorans* (NC\_017095) (Friedrich y Antranikian, 1996) y las secuencias preliminares de los genomas de *F. islandicum* (NZ\_JRRD000000000.2) (Huber et al., 1990; Lee et al., 2015) y el nuevo aislado, *Fervidobacterium thailandense* cepa FC2004 (LWAF01000000) (Kanoksilapatham et al., 2016), descrito en el Capítulo 3. La anotación de las transposasas de estos cuatro genomas sirvió para extraer las secuencias nucleotídicas de las ISs incluyendo los genes que codifican transposasas. Estas transposasas se clasificaron basándose en la similitud de las secuencias con las familias de transposasas propuestas por Siguier et al. (2014), disponible en la base de datos de ISFinder (<http://www-is.biotoul.fr>). A partir de estas secuencias de *Fervidobacterium*, el algoritmo de búsqueda Blast (Altschul et al., 1990)

permitió encontrar las secuencias homólogas, es decir, las secuencias más cercanas a los genes estudiados de las especies de *Fervidobacterium* en las bases de datos (NCBI; National Center for Biotechnology Information). Las secuencias más cercanas pertenecientes a la división Thermotogae, para cada uno de los grupos de transposasas, sirvieron como referencia a la hora de evaluar la posible ocurrencia de eventos HGT entre divisiones diferentes. Los alineamientos de secuencias dentro de una misma familia se realizaron con ClustalW (Thompson et al., 1994). Tras su alineamiento con las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes detectados construimos árboles filogenéticos utilizando MEGA (Tamura et al., 2013) mediante el método de “Neighbor joining”, con un valor de “bootstrap” de 1000 repeticiones.

#### **4.3.2. Análisis multivariable de frecuencias de tetranucleótidos**

Gracias a los análisis multivariable NMDS (Non-metric MultiDimensional Scaling) pudimos visualizar gráficamente la distribución de las secuencias de genes que codifican transposasas correspondientes a cada familia de los genomas de *Fervidobacterium* y de las secuencias relacionadas, incluyendo las secuencias más próximas de la división Thermotogae. Los análisis NMDS se construyeron usando R con el paquete Vegan (Oksanen et al., 2011). La distribución de frecuencias de tetranucleótidos (Dufraigne et al., 2005) fue el parámetro utilizado en estos análisis.

#### **4.3.3. Análisis de secuencias repetitivas**

Gracias a los alineamientos de las ISs con las secuencias más relacionadas, incluyendo los 1000 nucleótidos situados antes y después del gen que codifica la transposasa, pudimos detectar los fragmentos conservados de estas secuencias y definir las secuencias repetitivas (IRs típicas y secuencias palindrómicas) en los extremos de las ISs con ayuda de la información disponible en la base de datos

de ISFinder. Las comparaciones incluían el alineamiento de estos extremos de las ISs, sus porcentajes de identidad y las distancias (en número de nucleótidos) a los codones de inicio o de terminación del gen que codifica la transposasa de la IS comparada.

#### 4.3.4. Estimaciones de divergencia K-L

La divergencia entre los genes de una familia determinada de transposasas de *Fervidobacterium* y los genes relacionados se cuantificó aplicando la ecuación propuesta por Kullback-Leiber (K-L) (Kullback y Leibler, 1951; Techman et al., 2012):

$$D_{KL}(g||G) = \sum g(i) \ln (g(i)/G(i))$$

donde “i” sería el parámetro utilizado, en nuestro caso la frecuencia de cada tetranucleótido, “g”, el valor correspondiente al gen que codifica la transposasa de referencia, y “G”, dicho valor para la transposasa o el genoma completo del organismo a comparar.

### 4.4. Resultados

#### 4.4.1. Clasificación de las transposasas en genomas de *Fervidobacterium*

El número de posibles genes que codifican transposasas detectados en los genomas de *Fervidobacterium* (división Thermotogae) oscilaba entre 39 y 48 por genoma (Tabla 4.1). Estas transposasas pueden clasificarse en seis familias (IS6, IS110, IS200/IS605, ISL3, IS3 y IS4) más cuatro grupos aún no descritos (tipos A, B, C y D) que no mostraban relación con las familias de transposasas definidas en ISFinder (Siguier et al. 2006). Tal y como podemos observar en la Tabla 4.1, las transposasas de la familia IS6 (ISCpe7-like) eran las transposasas

**Tabla 4.1.** Clasificación de las IS detectadas en genomas de *Fervidobacterium*.

Familias de IS	Grupos de transposasas	<i>F. nodosum</i> Rt17-B1	<i>F. pennivorans</i> DSM 9078	<i>F. thailandense</i> FC2004	<i>F. islandicum</i> AW-1	HGT <sup>1</sup>
IS6	ISCpe7	23	24	12	34	s
IS110	IS116/IS110/IS902					
	IS110_I	6				s
	IS110_II	2	1		1	n
	IS110_III	1	6			n
IS200/IS605	IS200					
	IS200_I			1		n
	IS200_II			3		n
	IS200_III				2	n
	IS605 OrfB					
	IS605_I	1				s
	IS605_II		1	6		s
	IS605_III			1	2	n
ISL3	IS204/IS1001/IS1096/IS1165	8				s
IS3	IS3/IS911					
	IS3_I	2				n
	IS3_II				2	s
	IS3_III				1	s
IS4	IS4			6		n
Tipo A	Type A		2			n
Tipo B	Type B		4			s
Tipo C	Type C		3		1	s
Tipo D	Type D			5		s
Transposasas Totales		43	41	39	43	

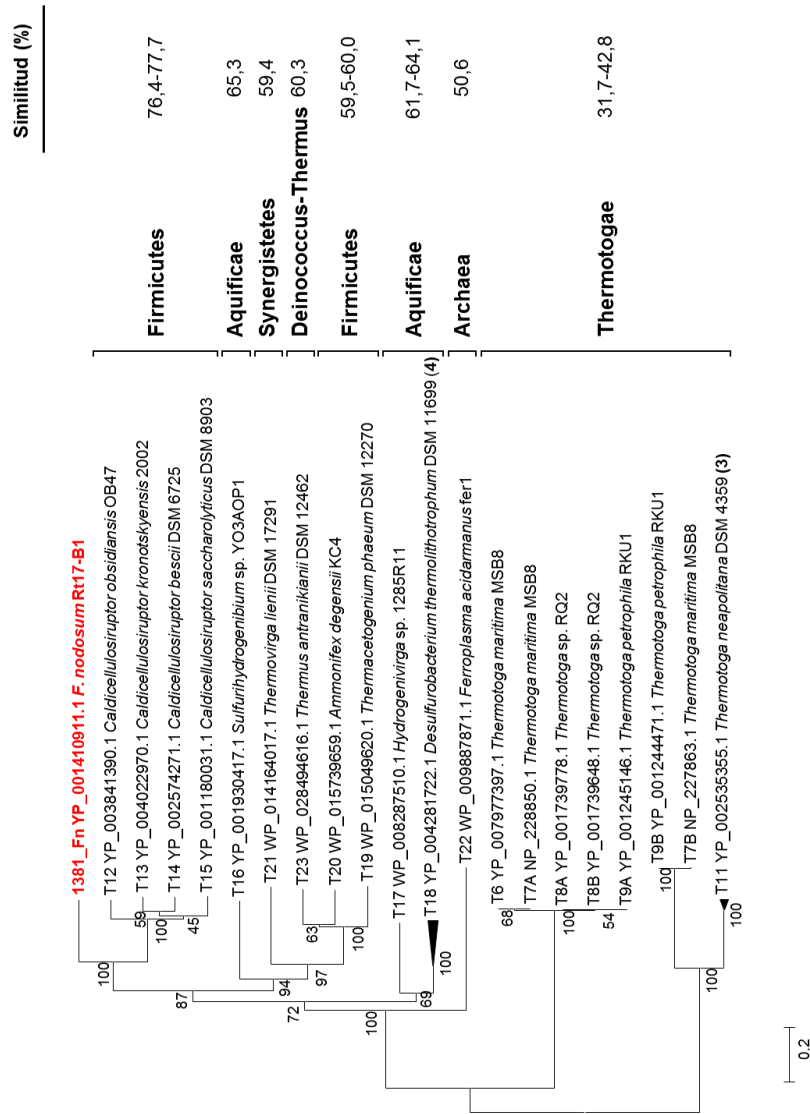
<sup>1</sup> Posible adquisición de estas secuencias a través de eventos de HGT entre distintas divisiones. Sí, s; No, n.



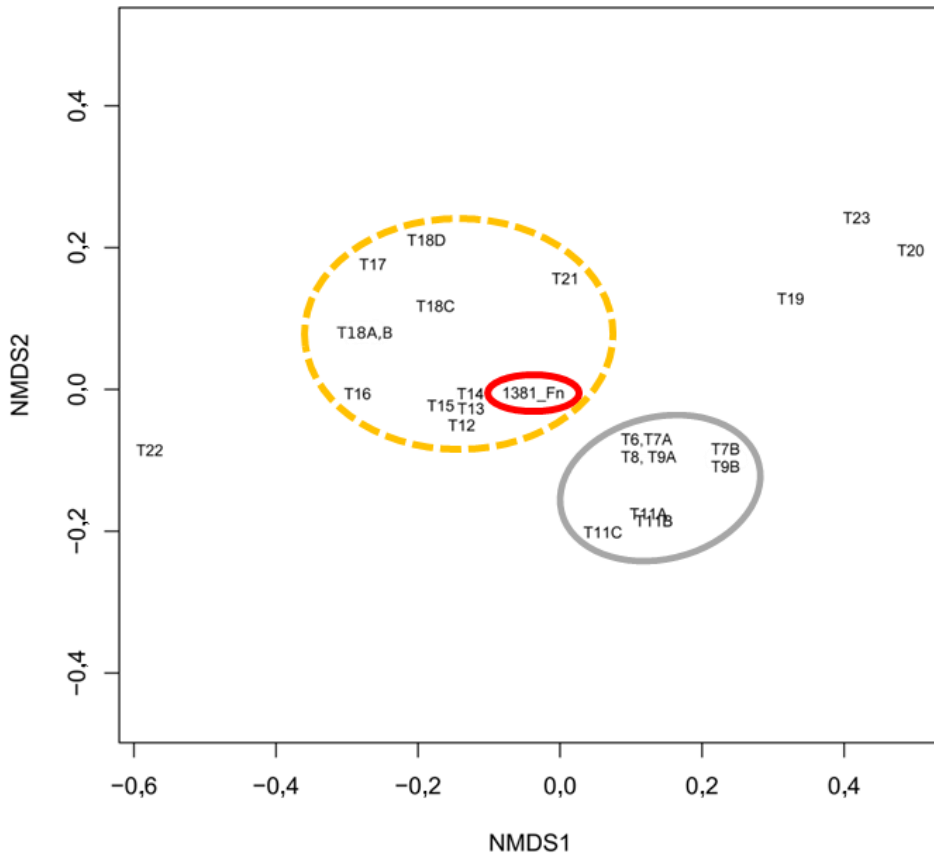
más frecuentes en los cuatro genomas analizados de *Fervidobacterium*: *F. nodosum* Rt17-B1 (23 copias), *F. pennivorans* DSM 9078 (24 copias), *F. islandicum* AW-1 (34 copias) y *F. thailandense* FC2004 (12 copias). El grado de similitud y su filogenia dieron lugar a la clasificación en subgrupos dentro de las familias IS110 (IS110\_I-IS110\_III), IS200/IS605 (IS200\_I-S200\_III; IS605\_I-IS605\_III) y IS3 (IS3\_I-IS3\_III). Los datos obtenidos permitieron caracterizar distintos procesos de HGT entre *Fervidobacterium* y otras divisiones (distintas de Thermotogae). Los resultados revelaron que las transposasas pertenecientes a los grupos ISCpe7, IS110, IS605\_I, IS605\_II, ISL3, IS3\_II, IS3\_III y los tipos B, C y D podrían estar implicados en eventos de HGT y haber sido adquiridos de especies pertenecientes a otras divisiones. Los casos de los grupos IS605\_I, ISL3, tipo C y tipo D han sido seleccionados como modelos representativos de esos procesos propuestos de HGT y analizados en detalle a continuación, mientras que los resultados correspondientes a los demás casos se presentan en el apartado 4.8 (Anexos).

#### 4.4.2. Transposasas IS605\_I

La filogenia de la copia del grupo IS605\_I detectada en *F. nodosum* mostró una mayor similitud con un grupo formado por representantes del género *Caldicellulosiruptor* (división Firmicutes; similitud de la secuencia de aminoácidos 77%; Figura 4.1). También se encontraron similitudes elevadas (60-65%) con transposasas pertenecientes a las divisiones Aquificae, Synergistetes y Deinococcus-Thermus y al dominio Archaea (*Ferroplasma acidarmanus*; 51%). En cambio, los representantes más cercanos pertenecientes a la división Thermotogae (*Thermotoga* spp.) para este tipo de transposasas forman un grupo filogenético diferente (Figura 4.1), mostrando una similitud mucho más baja (32-43%). Thermotogae y Firmicutes son dos divisiones que constituyen ramas independientes en los árboles filogenéticos (Doolittle, 1999). Estos resultados sugieren que el origen de las transposasas del tipo IS605\_I en *Fervidobacterium*



**Figura 4.1.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS605\_I de *F. nodosum* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de *F. nodosum*. Cuando se incluyen varias copias, el número de copias comparadas de cada secuencia se muestra entre paréntesis.



**Figura 4.2.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia del gen del grupo de transposasas IS605\_I de *F. nodosum* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.1). Línea roja, *F. nodosum*; línea discontinua amarilla, diversas divisiones relacionadas con la transposasa de *F. nodosum*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.

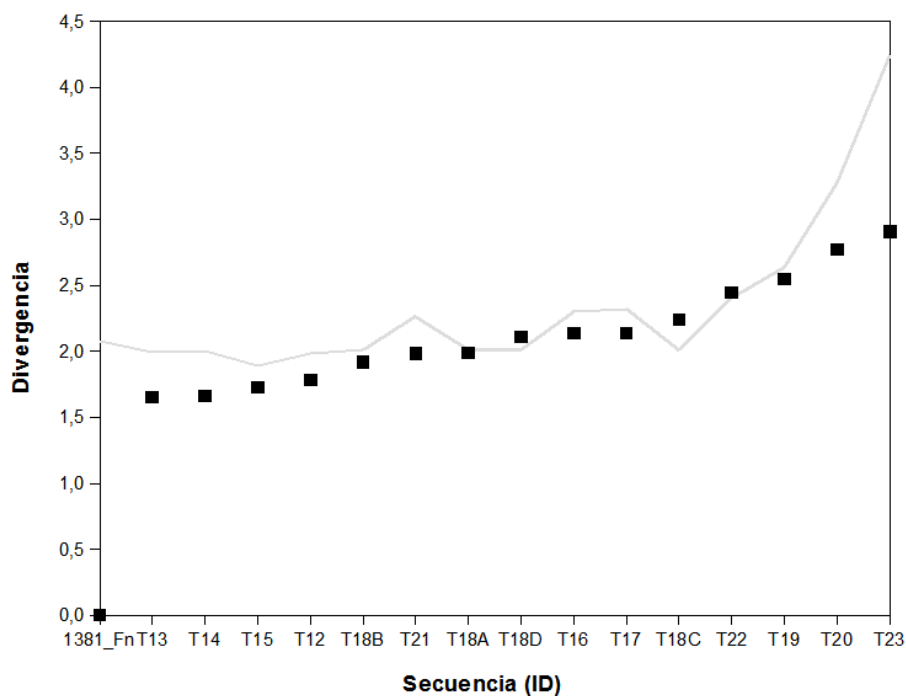


[illegible]

\* En esta y las siguientes tablas:

- Las flechas indican la localización de las secuencias palindrómicas (subrayadas).

- Los guiones representan la carencia de nucleótidos en el alineamiento.



**Figura 4.3.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. nododum* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS605\_I. Los cuadrados representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa de *F. nodosum* en relación al genoma completo de cada especie. La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.1).

*nodosum* podría situarse en la división Firmicutes en lugar de en sus parientes más cercanos dentro de la división Thermotogae.

El análisis NMDS de las frecuencias de tetranucleótidos también mostró un agrupamiento de la transposasa IS605\_I de *F. nodosum* (1381\_Fn) con las transposasas más cercanas filogenéticamente (Figura 4.2), principalmente pertenecientes al género *Caldicellulosiruptor* (división Firmicutes).

El análisis de las secuencias palindrómicas que flanquean los genes que codifican las transposasas reveló que las secuencias a la izquierda y a la derecha de dicho gen en *F. nodosum* presentaban gran similitud, 67-70% y 71-75%, respectivamente, con el género *Caldicellulosiruptor* (división Firmicutes) y de otros Firmicutes. Las similitudes también eran elevadas con secuencias de *Thermacetogenium phaeum*, 55 y 60%, y *Ammonifex degensii*, 73 y 78%. Se observaron similitudes algo inferiores tanto para las secuencias del extremo izquierdo como del derecho, con las secuencias pertenecientes a la división Aquificae (*Hydrogenivirga*, 42% y 57% y *Desulfurobacterium*, 44-46% y 76-80%). En contraste, las secuencias palindrómicas situadas en los extremos izquierdo y derecho de las ISs pertenecientes a la división Thermotogae presentaban valores de identidad inferiores (42-43% y 55-60%). Estos análisis revelaron que estas secuencias palindrómicas están altamente conservadas dentro de un mismo género y el elevado nivel de identidad observado entre distintas divisiones sugiere la existencia de relaciones tipo HGT (Tabla 4.2).

La estimación de divergencia K-L (Figura 4.3) también confirmó la proximidad entre las transposasas del subgrupo IS605\_I de *F. nodosum* y *Caldicellulosiruptor*. Al aumentar la distancia filogenética, aumentaba el valor de la divergencia K-L (Figura 4.1). Por ejemplo, los genes relacionados que codifican transposasas pertenecientes a otras divisiones mostraron una divergencia ligeramente superior (Figura 4.3). Los resultados obtenidos con los

diferentes métodos confirmaron una estrecha relación entre las transposasas IS605\_I de *F. nodosum* y las transposasas del mismo tipo de la división Firmicutes y otras divisiones, mientras que con las secuencias más cercanas de la división Thermotogae existía menor similitud.

#### 4.4.3. Transposasas ISL3

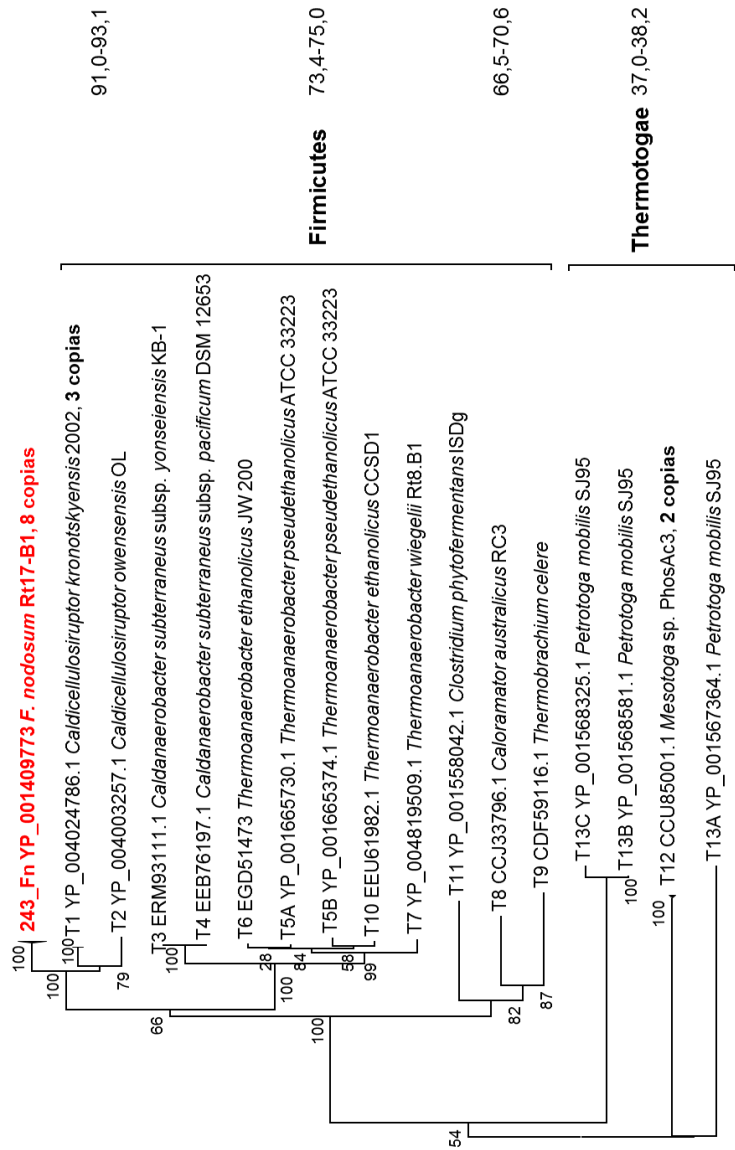
Algunos de los genes que codifican transposasas detectados en el genoma de *F. nodosum* se englobaban dentro de la familia ISL3. En concreto, en esta familia hay ocho transposasas en el genoma de *F. nodosum* (Tabla 4.1). Los análisis filogenéticos demostraron que estas se agrupaban junto con transposasas pertenecientes a *Caldicellulosiruptor* (Firmicutes; 91-93% de similitud) (Figura 4.4). Otros Firmicutes, como representantes de los géneros *Caldanaerobacter* y *Thermoanaerobacter* también presentaban secuencias relacionadas (73-75% de similitud). Los genes que codifican transposasas en otros géneros de Firmicutes, como *Clostridium*, *Caloramator* y *Thermobrachium*, mostraron una similitud un poco inferior (66-71%). Las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae presentaban mayor divergencia y mostraban menor similitud con *F. nodosum* (37-38%) que los anteriores géneros de Firmicutes (Figura 4.4).

Los resultados de los análisis filogenéticos (Figura 4.4) eran coherentes con la distribución observada en el análisis NMDS de frecuencias de tetranucleótidos (Figura 4.5). Así, los principales grupos diferenciados en el árbol filogenético también eran distinguibles en la visualización gráfica obtenida por NMDS (Figura 4.5). Las secuencias de *F. nodosum* y *Caldicellulosiruptor* forman un único grupo claramente diferenciado de otras secuencias relacionadas que mostraban similitudes más bajas.

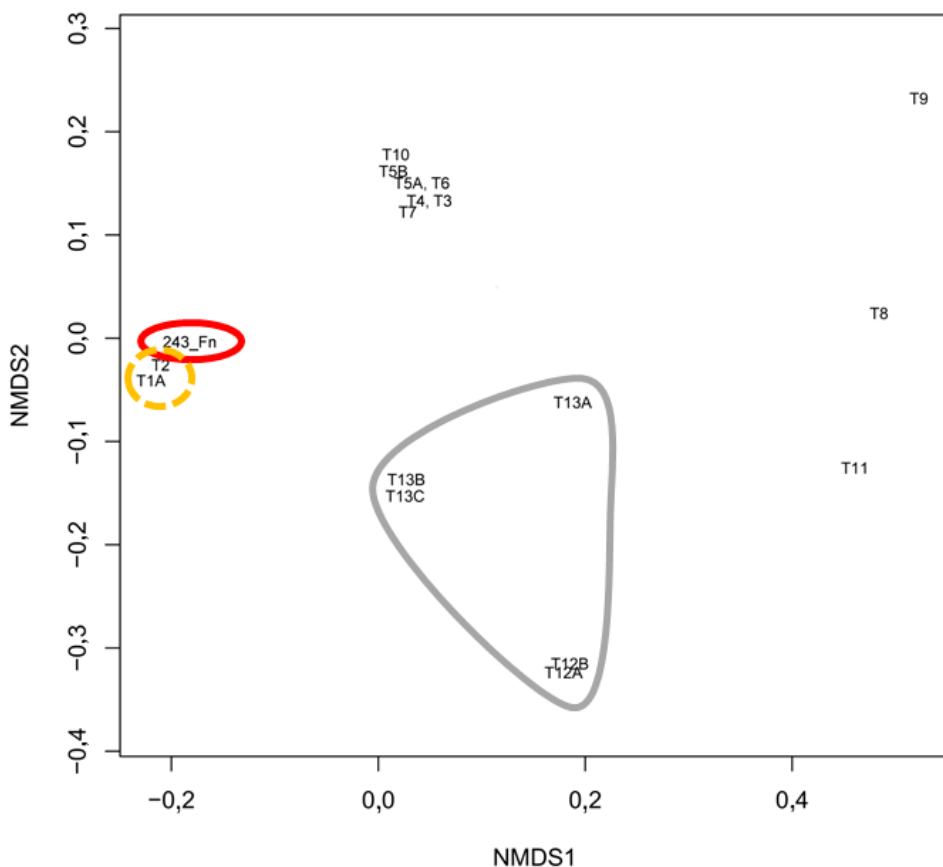
Las secuencias IR que flanquean los genes que codifican transposasas ISL3 en *F. nodosum* eran prácticamente idénticas entre ellas (Tabla 4.3). Las diferencias



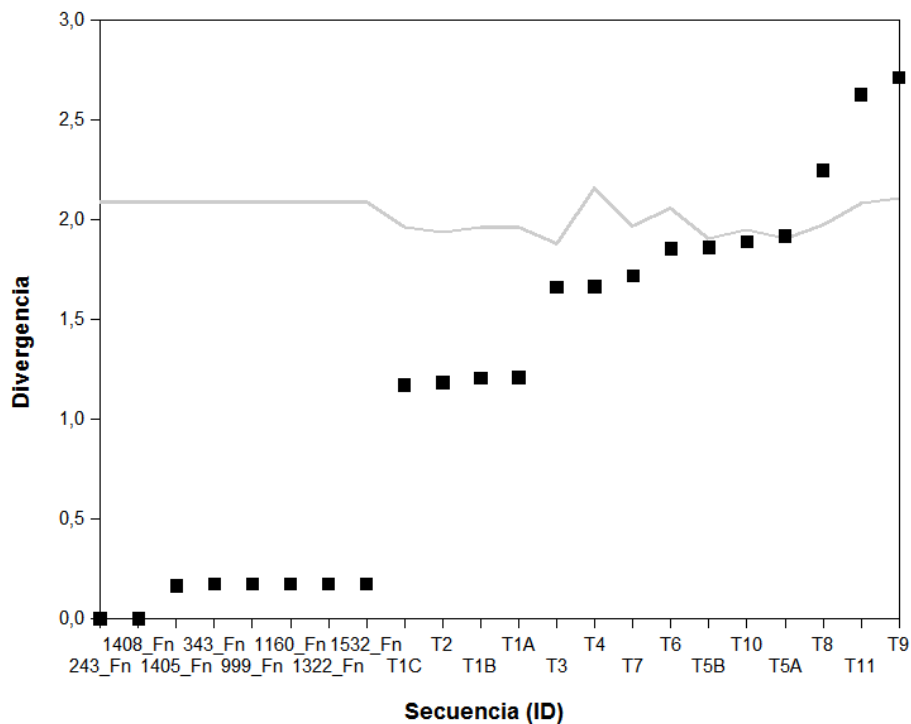
Similitud (%)



**Figure 4.4.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos de la familia de transposasas ISL3 de *F. nodosum* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia en *F. nodosum*.



**Figura 4.5.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes de la familia de transposasas ISL3 de *F. nodosum* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.4). Línea roja, *F. nodosum*; línea discontinua amarilla, *Caldicellulosiruptor* (Firmicutes); línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.



**Figura 4.6.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. nodosum* y genes relacionados dentro de la familia de transposasas ISL3. Los cuadrados representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa 243\_Fn de *F. nodosum* en relación al genoma completo de cada especie. La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.4).

**Tabla 4.3.** Secuencias repetitivas situadas a ambos extremos de la IS de la familia de transposasas ISL3 detectada en *F. nodosum* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las IRs del extremo izquierdo (**A**) y del extremo derecho (**B**) de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de *F. nodosum* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas. (Páginas siguientes). ►



ID	Número de acceso	Organismo	IR derecha	Identidad (%)
243_Fn	YP_001409773	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> GGCATTCAGAA TA CCCACCCCA C TACTTCA CAAAGAGCC	100.0
343_Fn	YP_001409873	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> .....	100.0
999_Fn	YP_001410529	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> .....	100.0
1160_Fn	YP_001410690	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> .....	100.0
1322_Fn	YP_001410852	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> .....	100.0
1405_Fn	YP_001410935	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> .....	100.0
1408_Fn	YP_001410938	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> .....	100.0
1532_Fn	YP_001411062	<i>Ferribacterium nodosum</i> R117-B1	<129 bp> .....	100.0
T2	YP_004003257	<i>Caldicellulosiruptor owenensis</i> OL	<126 bp> .....	92.5
T1A	YP_004024786	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> 2002	<128 bp> .....G.....A.....A.....	92.5
T1B	YP_004023466	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> 2002	<128 bp> .....G.....A.....A.....	92.5
T1C	YP_004022990	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> 2002	<128 bp> .....T.....A.....A.....	92.5
T3	ERM83111	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> KB-1	ND*	86.3
T4	EEB76197	<i>Carboxydibacterium proficuum</i> DSM 12853	< - bp> .....AAA.....A.....A.....	86.3
T7	YP_004819509	<i>Thermoanaerobacter wiggelli</i> R18.B1	<152 bp> .....AAA.....A.....A.....	86.3
T5A	YP_001665730	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> ATCC 33223	<164 bp> .....AAA.....A.....A.....	86.3
T6	EGD51473	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW 200	<153 bp> .....AAAA.....A.....A.....	82.2
T10	EEU61982	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> CCSD1	ND	-
T9B	YP_001665374	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> ATCC 33223	ND	-
T13B	YP_001568581	<i>Petroboga mobilis</i> S.95	<8 bp> AA.....AAA.T.CC.GTATTACCTTTTTCATCATCTCTC AGCTATCTAT .A.CA.T.....	29.4
T13C	YP_001568325	<i>Petroboga mobilis</i> S.95	<8 bp> AA.....AAA.T.CTC.GTATTACCTTTTTCATCATCTCTC AGCTATCT .A.CA.T.....G.....	28.2

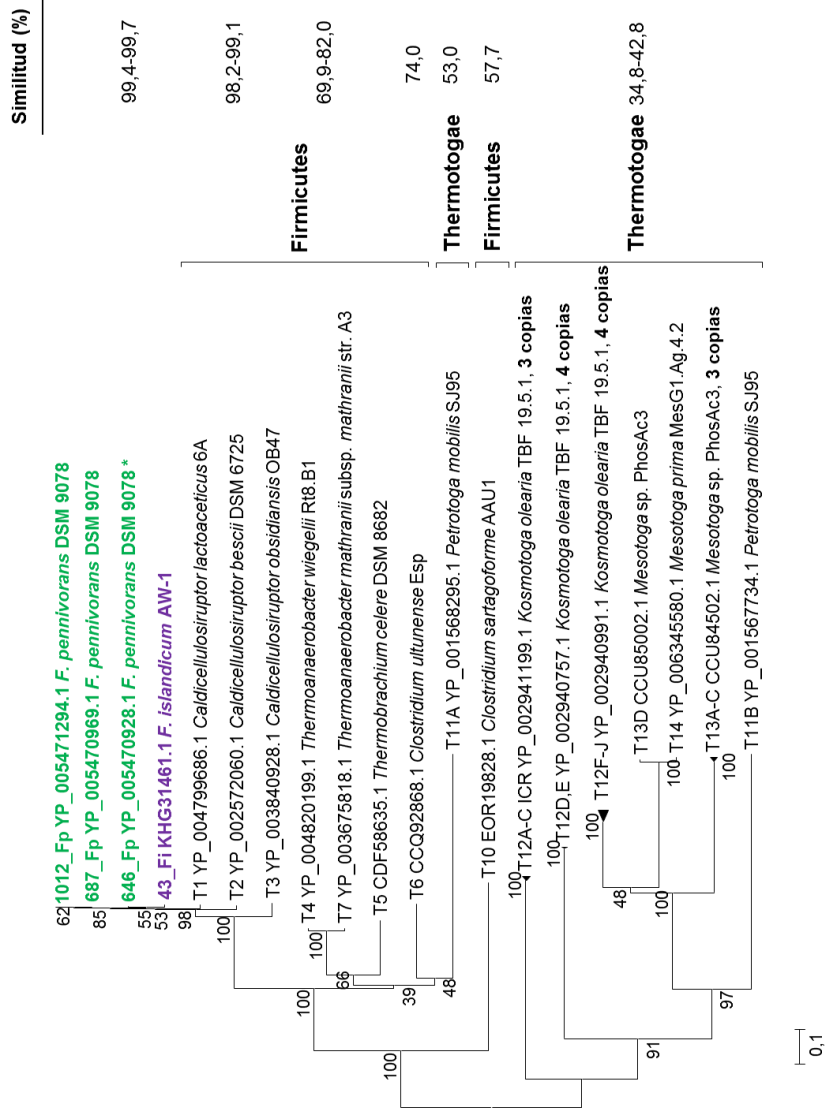
\* No detectada, ND.

con las secuencias correspondientes en *Caldicellulosiruptor* eran reducidas (89-92% de identidad) (Tabla 4.3). Otros genes que codifican transposasas ISL3 de Firmicutes mostraron secuencias IR también muy relacionadas pero un poco más distantes (75-86% de identidad), en paralelo con el aumento de distancia filogenética observada en el análisis filogenético (Figura 4.4). Las secuencias IR de transposasas ISL3 más cercanas dentro de la división Thermotogae eran muy distantes a las de *F. nodosum* y mostraban identidades por debajo de 35%, lo que correspondía con el grupo divergente observado en el análisis filogenético para este grupo (Figura 4.4).

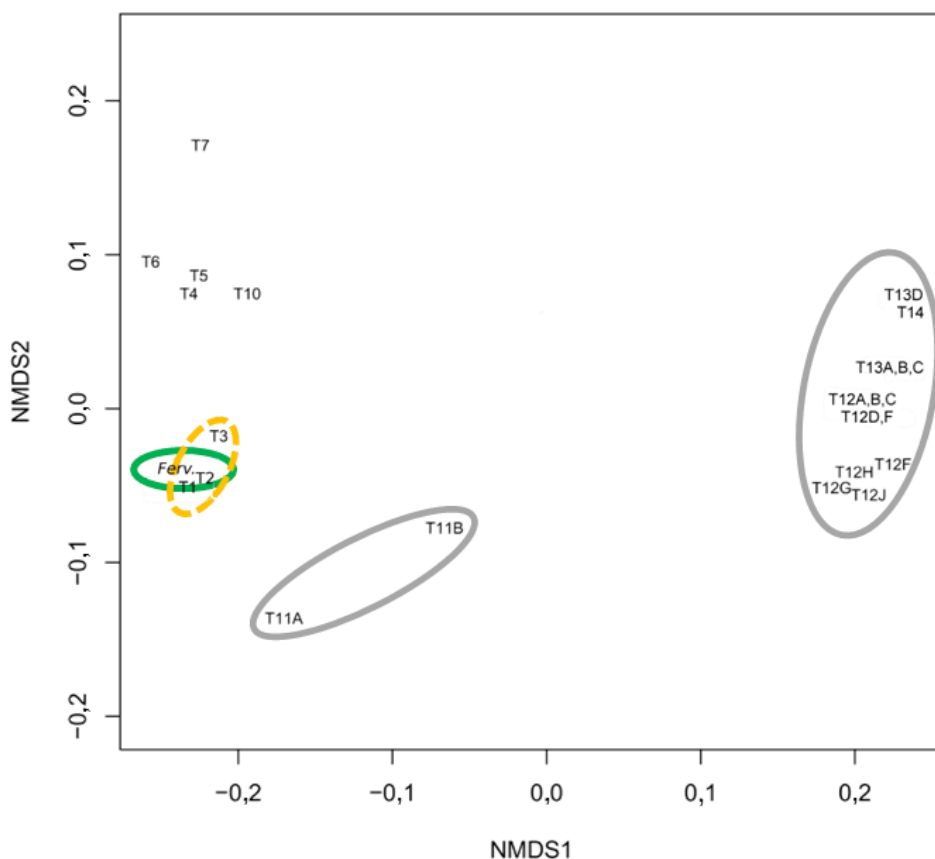
La divergencia K-L (Figura 4.6) mostraba resultados similares, es decir, se observó un aumento de la divergencia con el aumento de la distancia filogenética de modo similar a lo observado en las Figuras 4.4, 4.5 y la Tabla 4.3. Las grandes bifurcaciones presentes en el árbol de la Figura 4.4 estaban relacionadas con los distintos niveles de divergencia (Figura 4.6), siendo *Caldicellulosiruptor* el género que mostraba la menor divergencia con los genes que codifican transposasas ISL3 de *F. nodosum*.

#### 4.4.4. Transposasas Tipo C

Cuatro genes han sido clasificados dentro del grupo de transposasas tipo C en los genomas de *Fervidobacterium*, tres de ellos del genoma de *F. pennivorans* y uno del genoma de *F. islandicum*. Las secuencias más relacionadas con los genes que codifican transposasas de *Fervidobacterium* tipo C pertenecían al género *Caldicellulosiruptor* (Firmicutes; 98-99% de similitud) y forman un grupo filogenético único junto con las secuencias de *Fervidobacterium* (Figura 4.7). Otras transposasas relacionadas con el tipo C incluyen secuencias de la división Firmicutes, detectadas en *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium* y *Clostridium* (70-82% de similitud). La transposasa más cercana dentro de la división Thermotogae pertenece a *Petrotoga mobilis* (53% de similitud). Otras secuencias



**Figure 4.7.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas tipo C de *Fervidobacterium* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. pennivorans*.



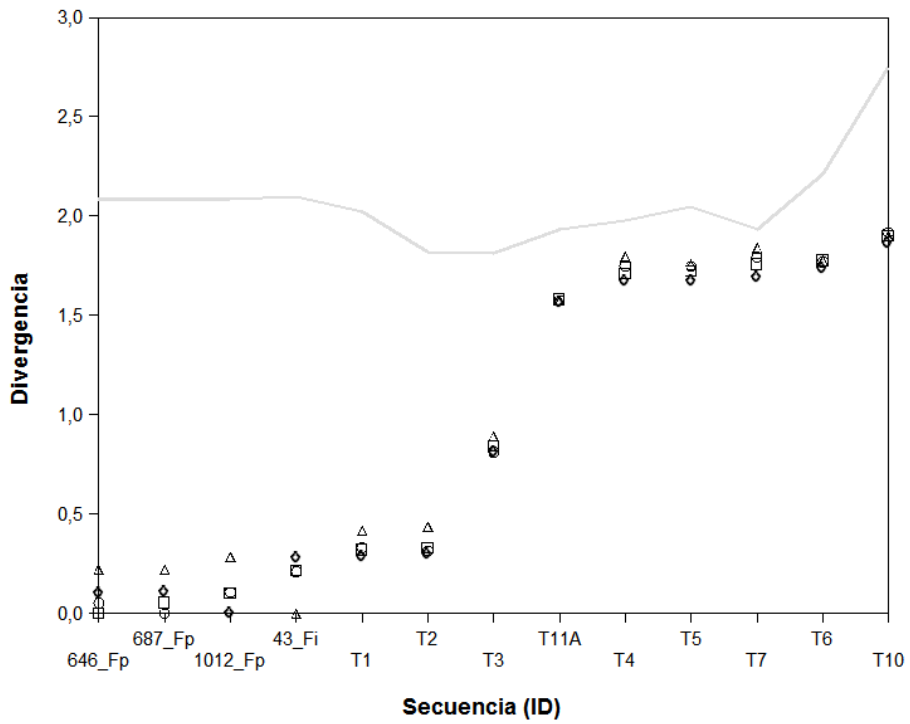
**Figura 4.8.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas tipo C de *Fervidobacterium* (*Ferv.*) y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.7). Línea verde, *Fervidobacterium* (*Ferv.*); línea discontinua amarilla, *Caldicellulosiruptor* (Firmicutes); líneas continuas en gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.



**Tabla 4.4.** Secuencias repetitivas situadas a ambos extremos de la IS del grupo de transposasas tipo C detectadas en *Ferriodobacterium* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las IRs del extremo izquierdo (A) y del extremo derecho (B) de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de la transposasa 646\_Fp de *Ferriodobacterium* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas.

A	ID	Número de acceso	Organismo	IR izquierda	Identidad (%)
				10 20 30 40 50 60 70	
				..... .....	





**Figura 4.9.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *Fervidobacterium* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas tipo C. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa 646\_Fp de *Fervidobacterium* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 43\_Fi (triángulos), 646\_Fp (cuadrados), 687\_Fp (círculos) y 1012\_Fp (rombos). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.7).

de la división Thermotogae formaban un grupo filogenético independiente con niveles de similitud por debajo del 43% (35-43%).

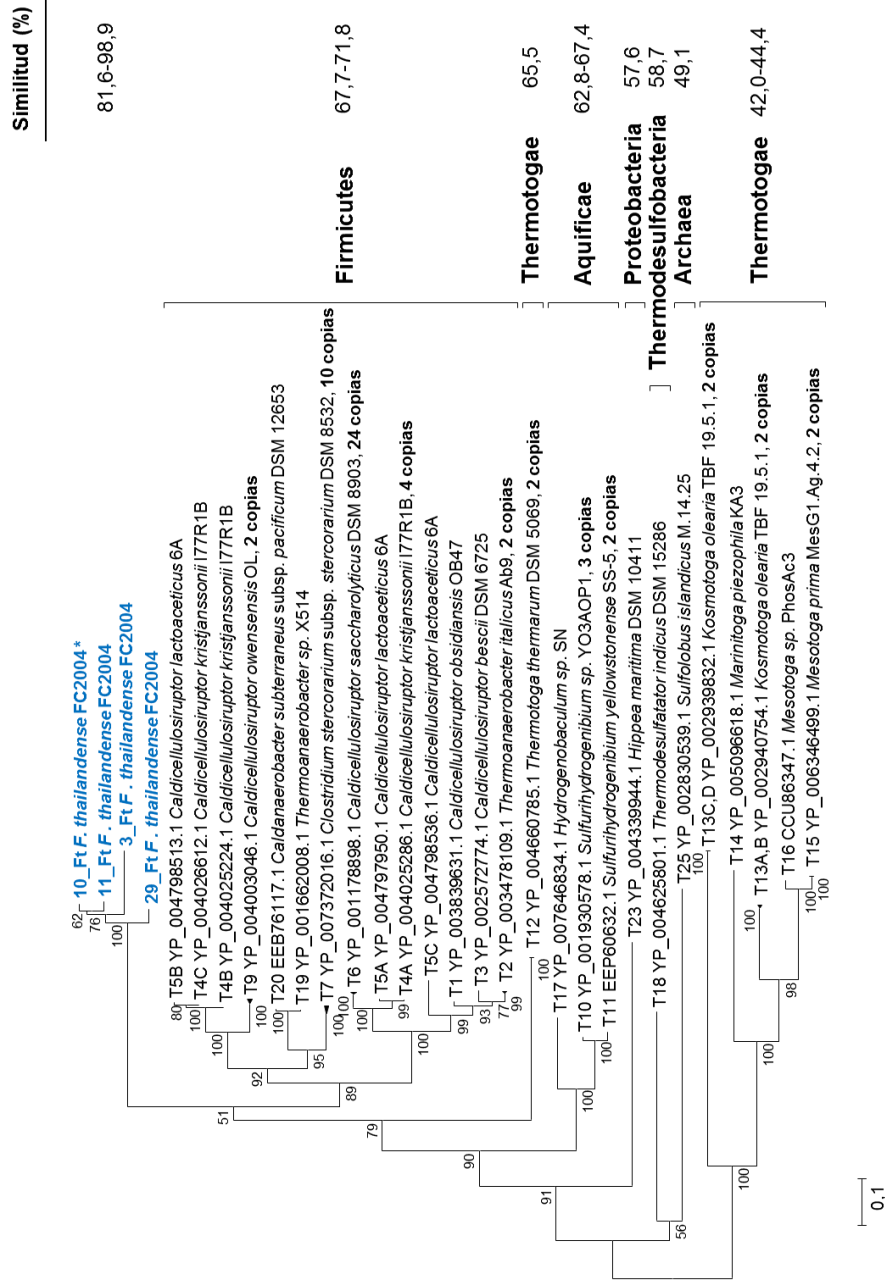
El análisis NMDS de frecuencias de tetranucleótidos (Figura 4.8) distinguía el grupo filogenético formado por transposasas de tipo C de *Fervidobacterium* y *Caldicellulosiruptor*. Otras secuencias relacionadas dentro de la división Firmicutes que se agrupaban filogenéticamente también aparecían agrupadas en el análisis NMDS. La mayoría de las secuencias pertenecientes a la división Thermotogae se mostraban claramente separadas y distantes (Figura 4.8).

*F. pennivorans* y *F. islandicum* mostraban secuencias IR idénticas (Tabla 4.4). La secuencia IR situada a la derecha de la transposasa tipo C de *F. islandicum* no fue detectada. Las transposasas tipo C de *Caldicellulosiruptor* presentaban secuencias IR prácticamente idénticas (97-100% de identidad) a *Fervidobacterium*. Otros Firmicutes relacionados mostraban identidades de 74-86% con las secuencias IR de las transposasas tipo C de *Fervidobacterium*. La identidad de secuencias IR con otros Thermotogae fue mucho más baja (42-56% de identidad) que la de los Firmicutes más relacionados.

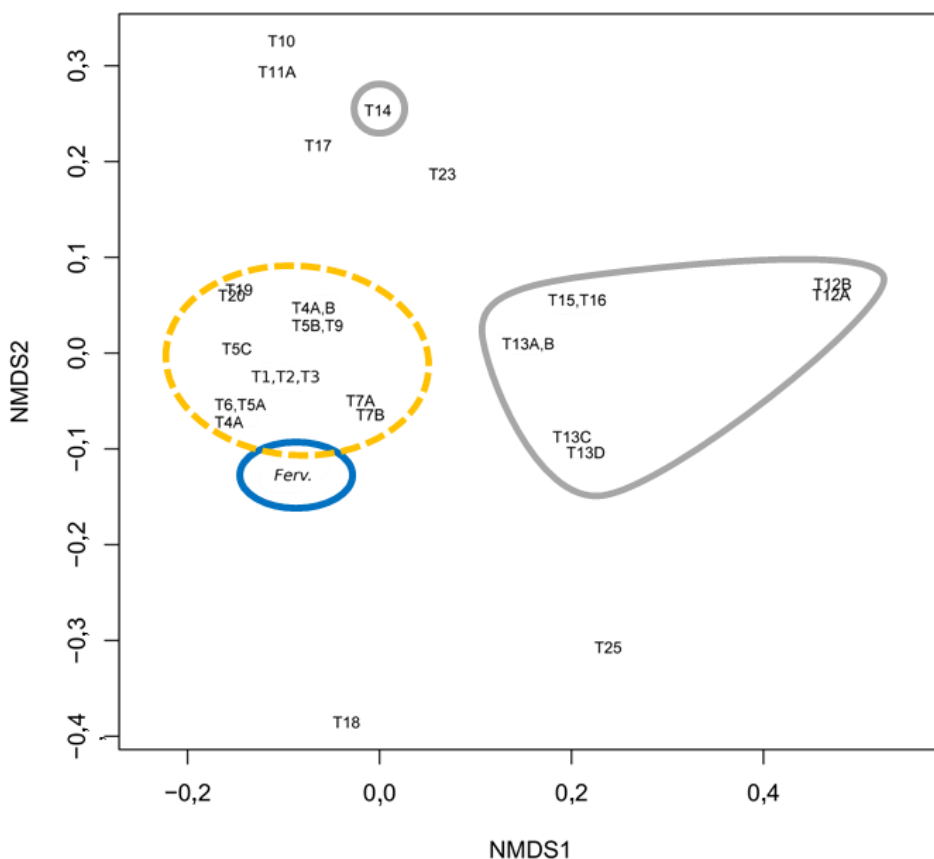
La divergencia K-L de la distribución de frecuencias de tetranucleótidos también confirmó la proximidad entre las secuencias de genes que codifican transposasas tipo C de *Caldicellulosiruptor* y *Fervidobacterium* (Figura 4.9). Los valores de divergencia entre los genes que codifican transposasas tipo C de *Fervidobacterium* y *Caldicellulosiruptor* eran bajos. Otras secuencias de Firmicutes y Thermotogae presentaban valores de divergencia K-L bastante más elevados.

#### **4.4.5. Transposasas Tipo D**

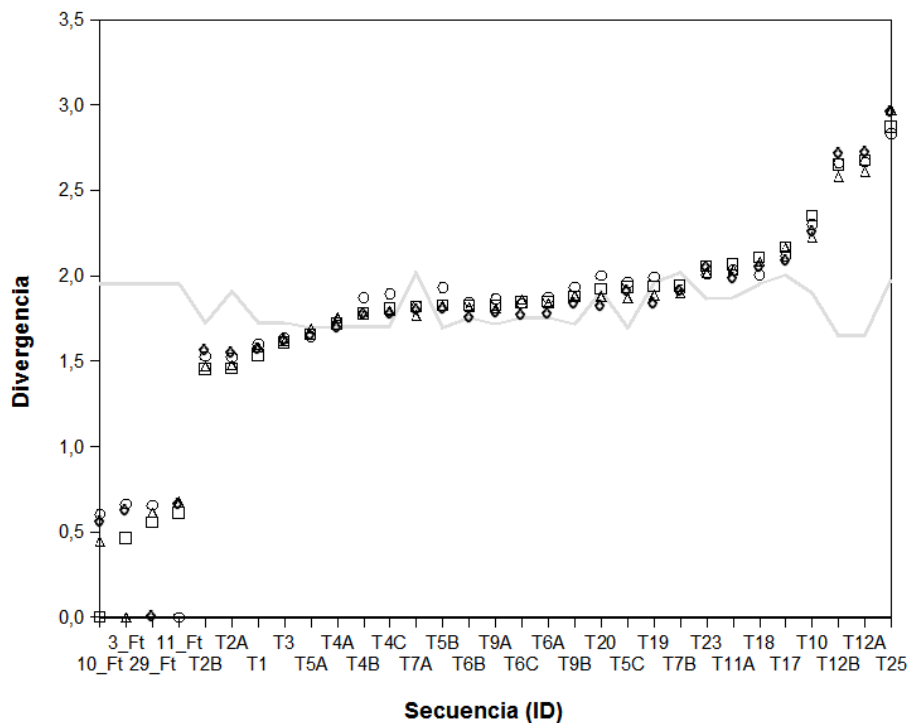
Las transposasas tipo D sólo fueron detectadas en *Fervidobacterium*



**Figura 4.10.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas tipo D de *F. thailandense* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. thailandense*.



**Figura 4.11.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas tipo D de *F. thailandense* (*Ferv.*) y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.10). Línea continua azul, *F. thailandense* (*Ferv.*); línea discontinua amarilla, Firmicutes; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.



**Figura 4.12.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. thailandense* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas tipo D. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa 10\_Ft de *F. thailandense* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 3\_Ft (triángulos), 10\_Ft (cuadrados), 11\_Ft (círculos) y 19\_Ft (rombos). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.10).

**Tabla 4.5.** Secuencias repetitivas situadas a ambos extremos de la IS del grupo de transposasas tipo D detectadas en *F. thailandense* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las IRs del extremo izquierdo (**A**) y del extremo derecho (**B**) de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de *F. thailandense* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas. (Páginas siguientes). ►





[illegible]

No detectada, ND.

*thailandense*, detectándose cinco copias en su genoma. Estos genes que codifican transposasas en *Fervidobacterium* presentan como secuencias más cercanas genes pertenecientes a Firmicutes (68-72% de similitud; Figura 4.10), específicamente a los géneros *Caldicellulosiruptor* y algunas secuencias de *Caldanaerobacter*, *Thermoanaerobacter* y *Clostridium*, que formaban un solo grupo filogenético cercano a las transposasas tipo D de *Fervidobacterium*. Un gen que codifica una transposasa en *Thermotoga thermarum* presentaba menor similitud que los genes de Firmicutes (65%) y se situaba en una rama cercana pero claramente diferenciada de los anteriores. Otros genes relacionados pertenecientes a la división Thermotogae presentaban similitudes mucho más bajas (42-44%) y constituyen un grupo filogenético divergente. Existían también otros genes relacionados con las transposasas tipo D de *Fervidobacterium* que mostraban similitudes inferiores, y que incluían representantes de la división Aquificae (63-67%), Proteobacteria (58%), Thermodesulfobacteria (59%) y del dominio Archaea (49%) (Figura 4.10).

El análisis NMDS de frecuencias de tetranucleótidos (Figura 4.11) mostró un patrón similar al observado en el análisis filogenético. Los genes que codifican transposasas tipo D en *Fervidobacterium* se agrupan junto a los genes más cercanos de Firmicutes y se diferencian claramente de las transposasas de otros grupos taxonómicos, incluyendo Thermotogae.

Las secuencias IR situadas en los extremos de las ISs tipo D (Tabla 4.5) en *Fervidobacterium thailandense* estaban altamente conservadas (95-100% de identidad). Las identidades de secuencias entre las IRs de *Fervidobacterium* y algunas especies de *Caldicellulosiruptor* eran 59% y 67% en los extremos izquierdos y derechos de las ISs, respectivamente. Otros Firmicutes (*Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter*, *Clostridium*) presentaban identidades entre 50 y 69% revelando la proximidad entre IRs de *Fervidobacterium* y algunos Firmicutes. Las transposasas detectadas en

Thermotogae relacionadas con este tipo de transposasas presentaban identidades entre 30% y 43%, en coherencia con la mayor distancia filogenética observada frente a transposasas tipo D de *Fervidobacterium*.

Las secuencias de genes correspondientes a las transposasas tipo D de *Fervidobacterium* y los Firmicutes mencionados en el párrafo anterior presentaban valores de divergencia K-L relativamente bajas. A medida que aumentamos la distancia filogenética (Figura 4.10) aumentaban progresivamente los valores de divergencia K-L (Figura 4.12) sugiriendo resultados paralelos entre los diferentes métodos de análisis de HGT utilizados en este estudio.

## 4.5. Discusión

Las transposasas están relacionadas con la movilidad del ADN en y, probablemente, entre genomas (Ochman et al., 2000; Frost et al., 2005) lo que sugiere que sus genes pueden representar un modelo para la detección y análisis de procesos de HGT y su influencia en la plasticidad y evolución de los genomas bacterianos. En nuestro caso, abordamos el estudio de las transposasas en varios genomas de *Fervidobacterium*. Gracias a la utilización de diferentes métodos para detectar posibles eventos de HGT de estas secuencias, hemos comprobado la presencia de varias transposasas que reflejaban fenómenos de HGT.

Debido a que, generalmente, las ISs están conservadas en un amplio rango de taxones procariotas (Wagner, 2006; Hooper et al., 2009) y a que su mecanismo de transposición puede promover su propia duplicación, es de esperar que los genes que codifican transposasas presenten secuencias relativamente homogéneas en comparación con otros genes del taxón. Wagner (2006) propuso que las ISs podrían experimentar periodos de extinción en poblaciones procariotas y podrían ser reintroducidas a través de fenómenos de HGT,

reduciendo así los posibles efectos negativos a largo plazo de su expansión masiva en los genomas de células procariotas. Sin embargo, se ha sugerido que las ISs representan beneficios evolutivos a corto plazo lo que justifica su participación en la adaptación de las especies y la plasticidad de los genomas (Lorenz y Wakernagel, 1994; Ochman et al., 2000; Wiedenbeck y Cohan, 2011). Por tanto, la detección de los genes que codifican transposasas en un genoma representa una imagen puntual en un momento dado del estado del genoma de una célula procariota y proporciona indicaciones del posible flujo genético que afecta a la historia relativamente reciente de taxones específicos.

Utilizando como referencia las ISs de los genomas de *Fervidobacterium* y analizando el rango de variabilidad con las secuencias relacionadas más cercanas, así como aquellas secuencias más próximas dentro de la división Thermotogae, podemos detectar aquellas ISs con posibilidades de haber sido incorporadas a través de eventos HGT entre distintas divisiones. Estos eventos de HGT entre microorganismos filogenéticamente distantes son fácilmente distinguibles de posibles transferencias verticales de ADN dentro del contexto genómico de un taxón. El análisis llevado a cabo en este estudio implica diferentes estrategias para discriminar el origen de las ISs, incluyendo análisis filogenéticos, análisis multidimensionales, cuantificación de la divergencia y análisis comparativos de sus IRs. Estos métodos generalmente coincidían a la hora de sugerir eventos de HGT de ISs entre *Fervidobacterium* y otras divisiones. El uso de genes que codifican transposasas como secuencias modelo y los diferentes procedimientos utilizados para detectar eventos de HGT entre divisiones diferentes han demostrado que representan herramientas muy útiles para el análisis de HGT.

Los análisis filogenéticos mostraban agrupamientos de secuencias de transposasas de *Fervidobacterium* y secuencias relacionadas por su similitud. Los análisis multidimensionales (NMDS) de frecuencias de tetranucleótidos

también confirmaron los agrupamientos observados en los análisis filogenéticos y permitían la visualización de los grupos de manera gráfica. Las medidas cuantitativas de divergencia de los genes que codifican transposasas confirman valores crecientes en paralelo al aumento de la distancia filogenética. Por último, la detección de secuencias IR flanqueando los genes que codifican transposasas confirmó la funcionalidad de estas transposasas y, probablemente, su incorporación relativamente reciente (Wagner, 2006) en estos genomas, aunque el mecanismo real de transferencia de estas secuencias aún se desconoce.

Este estudio muestra claramente la relación de flujo de genes entre genomas de *Fervidobacterium* y otras divisiones procariotas. La relación de HGT entre divisiones diferentes que más frecuentemente hemos detectado ocurría entre genomas de *Fervidobacterium* y Firmicutes. Específicamente, los genomas de *Caldicellulosiruptor* compartían múltiples ISs en común con genomas de *Fervidobacterium*, presentando, algunos de ellos, hasta un 99% de similitud en la secuencia de aminoácidos e identidades en la secuencia de nucleótidos de IRs de 100%. Estos resultados se compararon con las ISs relacionadas, para cada una de las familias, dentro de la división Thermotogae (más allá del género *Fervidobacterium*) y mostraron similitudes de aminoácidos e identidades de secuencias de nucleótidos de IRs generalmente por debajo del 50%. Estos datos confirman claramente la existencia de fenómenos de HGT entre estos dos géneros, *Fervidobacterium* y *Caldicellulosiruptor*, pertenecientes a divisiones diferentes.

Otros miembros de la división Firmicutes (por ejemplo, *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobacter*, *Caloramator*, *Thermobracchium* y *Clostridium* entre otros) también presentaban posibles eventos de HGT con el género *Fervidobacterium*. También, otras bacterias de otras divisiones (por ejemplo, Aquificae, Synergistetes, Deinococcus-Thermus, Thermodesulfobacteria, Proteobacteria) y algunas arqueas parecían estar implicadas en eventos de HGT relativamente

recientes con *Fervidobacterium*. Curiosamente, la mayoría de estos representantes que presentaban relaciones de HGT con *Fervidobacterium* eran también termófilos, lo que confirma el requisito de que las células han de ser capaces de compartir un hábitat para poder intercambiar ADN (Hooper et al., 2009).

## 4.6. Conclusiones

La diversidad de genes que codifican transposasas detectada dentro del género *Fervidobacterium* sugiere que estas secuencias contribuyen de manera importante a la adaptación y evolución de estas bacterias y sus genomas al medio ambiente. La participación real de las transposasas en la plasticidad de los genomas, su papel en los procesos de HGT, la tasa de eventos de HGT y la duplicación de los genes que codifican transposasas y su intercambio continúan siendo escasamente conocidos. Este estudio demuestra la relevancia de las transposasas en la HGT utilizando el género *Fervidobacterium* como modelo de estudio y muestra que las ISs pueden ser utilizadas para detectar fenómenos de HGT entre procariotas filogenéticamente distantes y para identificar los taxones involucrados en los posibles intercambios de ADN genómico.

## 4.7. Bibliografía

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Aravind, L., Tatusov, R. L., Wolf, Y. I., Wickett, D. R., Koonin, E. V. (1998) Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet.* 14: 442-444.
- Boto, L. (2010) Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc. R. Soc. B.* 277: 819-827.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10494-10499.
- Doolittle, W. F. (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284: 2124-2128.
- Dufraigne, C., Fertil, B., Lespinats, S., Giron, A., Deschavanne, P. (2005) Detection and characterization of horizontal transfers in prokaryotes using genomic signature. *Nucl. Acids Res.* 33: e6.
- Friedrich, A. B., Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennivorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2875-2882.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature* 3: 722-732.
- Hooper, S. D., Mavromatis, K., Kyrpides, N. C. (2009) Microbial co-habitation and lateral gene transfer: what transposases can tell us. *Genome Biol.* 10: R45.
- Huber, R., Woese, C. R., Langworthy, T. A., Kristjansson, J. K., Stetter, K. O. (1990) *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the “Thermotogales”. *Arch. Microbiol.* 154: 105-111.

- Kanoksilapatham, W., Pasomsup, P., Keawram, P., Cuecas, A., Portillo, M. C., Gonzalez, J. M. (2016) *Fervidobacterium thailandense* sp. nov., a novel hyperthermophilic bacterium isolated from a hot spring in Northern Thailand. *Intl. J. Syst. Environ. Microbiol.* 66: 5023-5027.
- Keller, M., Zengler, K. (2004) Tapping into microbial diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 141-150.
- Kullback, S., Leibler, R. A. (1951) On information and sufficiency. *Ann. Math. Stat.* 22: 79-86.
- Lee, Y.-J., Jeong, H., Park, G.-S., Kwak, Y., Lee, S. J., Lee, S. J., Park, M. K., Kim, J. Y., Kang, H. K., Shin, J.-H., Lee, D.-W. (2015) Genome sequence of a native-feather degrading extremely thermophilic Eubacterium, *Fervidobacterium islandicum* AW-1. *Stand. Genomic. Sci.* 10: 71.
- Lorenz, M. G., Wakernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58: 563-602.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C., Fraser, C. M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399: 323-329.
- Nesbø, C. L., Baptiste, E., Curtis, B., Dahle, H., Lopez, P., Macleod, D., Dlutek, M., Bowman, S., Zhaxybayeva, O., Birkeland, N. K., Doolittle, W. F. (2009) The genome of *Thermosiphon africanus* TCF52B: lateral genetic connections to the Firmicutes and Archaea. *J. Bacteriol.* 191: 1974-1978.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., Groisman, E. A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, H. H., Wagner, H. (2011) Vegan:

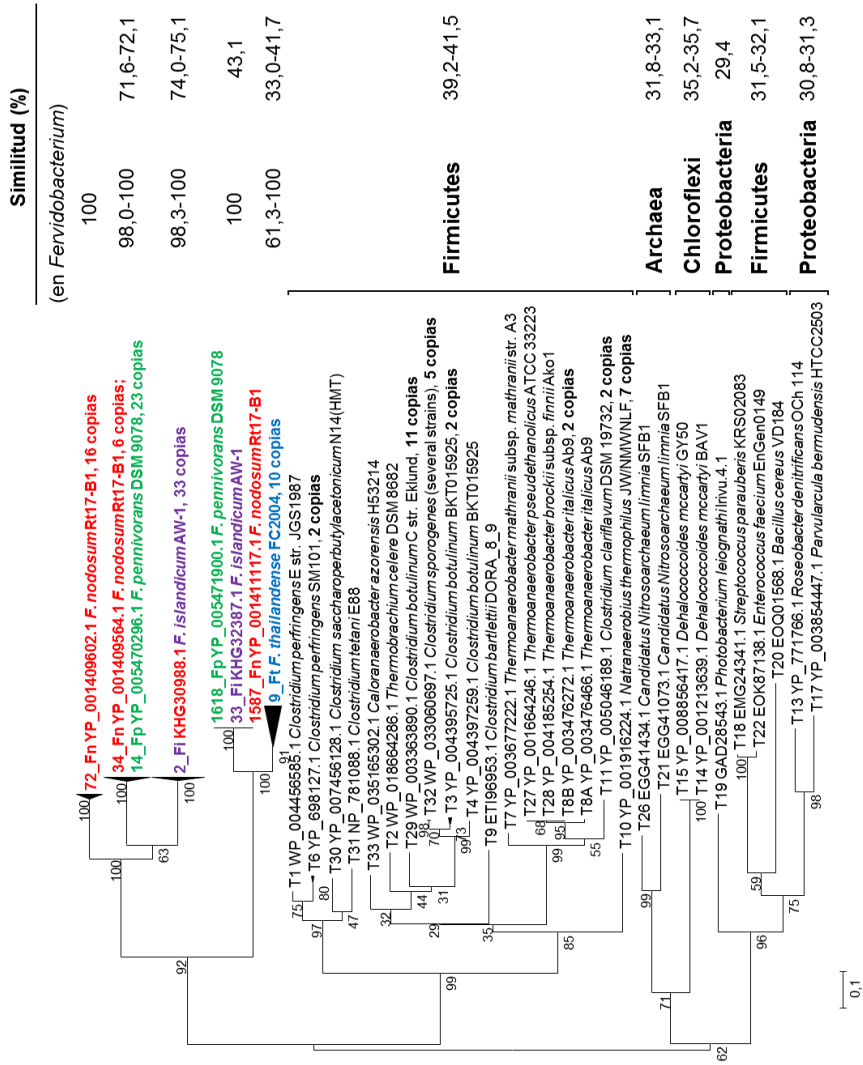


- community ecology package. R package v.2.0-2.; Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Patel, B. K. C., Morgan, H. W., Daniel, R. M. (1985) *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 141: 63-69.
- Siguier, P., Gournayre, E., Chandler, M. (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38: 865-891.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M. (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucl. Acids Res.* 34: D32-D36.
- Snyder, L., Champness, W. (2007) *Molecular genetics of bacteria*. ASM Press, Washington, U. S. A..
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Techman, S. M., Lebedinsky, A. V., Colman, A. S., Sokolova, T. G., Woyke, T., Goodwin, L., Robb, F. T. (2012) Evidence for horizontal gene transfer of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase. *Front. Microbiol.* 3: 132.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix-choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- van Wolferen, M., Ajon, M., Driessen, A. J., Albers, S. V. (2013) How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions. *Extremophiles* 17: 545-563.
- Wagner, A. (2006) Periodic extinctions of transposable elements in bacterial lineages: evidence from intragenomic variation in multiple genomes. *Mol. Biol. Evol.* 23: 723-733.
- West, S. A., Diggle, S. P., Buckling, A., Gardner, A., Griffin, A. S. (2007) The Social Lives of Microbes. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 53-77.

- Wiedenbeck, J., Cohan, F. M. (2011) Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 957-976.
- Zhaxybayeva, O., Swithers, K. S., Lapierre, P., Fournier, G. P., Bickhart, D. M., DeBoy, R. T., Nelson, K. E., Nesbø, C. L., Doolittle, W. F., Gogarten, J. P., Noll, K. M. (2009) On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 5865-5870.

## 4.8. Anexos

Las siguientes páginas muestran los resultados de los grupos de transposasas de *Fervidobacterium* (Tabla 4.1; página 138) que no han sido descritos anteriormente en este capítulo.



**Figura 4.13.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos de la familia de transposasas IS6 de *Fervidobacterium* y las secuencias más relacionadas. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (72\_Fn) de *F. nodosum*. También se presenta el porcentaje de similitud dentro de cada rama en el género *Fervidobacterium*.

**Figura 4.14.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para las secuencias de genes de la familia de transposasas IS6 de *Fervidobacterium* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.13). Línea roja, *F. nodosum*; línea verde, *F. pennivorans*; línea azul, *F. thailandense*; línea púrpura, *F. islandicum*; línea discontinua amarilla, división *Firmicutes*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división *Thermotogae*. (Página 175) ►

**Figura 4.15.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *Fervidobacterium* y genes relacionados dentro de la familia de transposasas IS6. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas dentro de *Fervidobacterium* (A) y con secuencias relacionadas (B); las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *Fervidobacterium* en relación al genoma completo de cada especie (C). Se representa el valor medio para el subgrupo 72\_Fn\_a (cuadrado; línea continua gris claro), 34\_Fn\_a (círculos; línea continua gris medio), 14\_Fp\_a (rombos; línea continua gris oscuro), 2\_Fi\_a (triángulos; línea continua negra), 1587\_Fn\_a (triángulos invertidos; línea discontinua gris claro) y 9\_Ft\_a (xxx; línea discontinua gris oscuro). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.13). (Página 176) ►

**Tabla 4.6.** Secuencias repetitivas situadas a ambos extremos de la IS de la familia de transposasas IS6 detectadas en *Fervidobacterium* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las IRs del extremo izquierdo (A) y del extremo derecho (B) de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de la transposasa 1544\_Fn de *F. nodosum* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas. (Páginas de la 177 a la 180) ►

Figura 4.14.

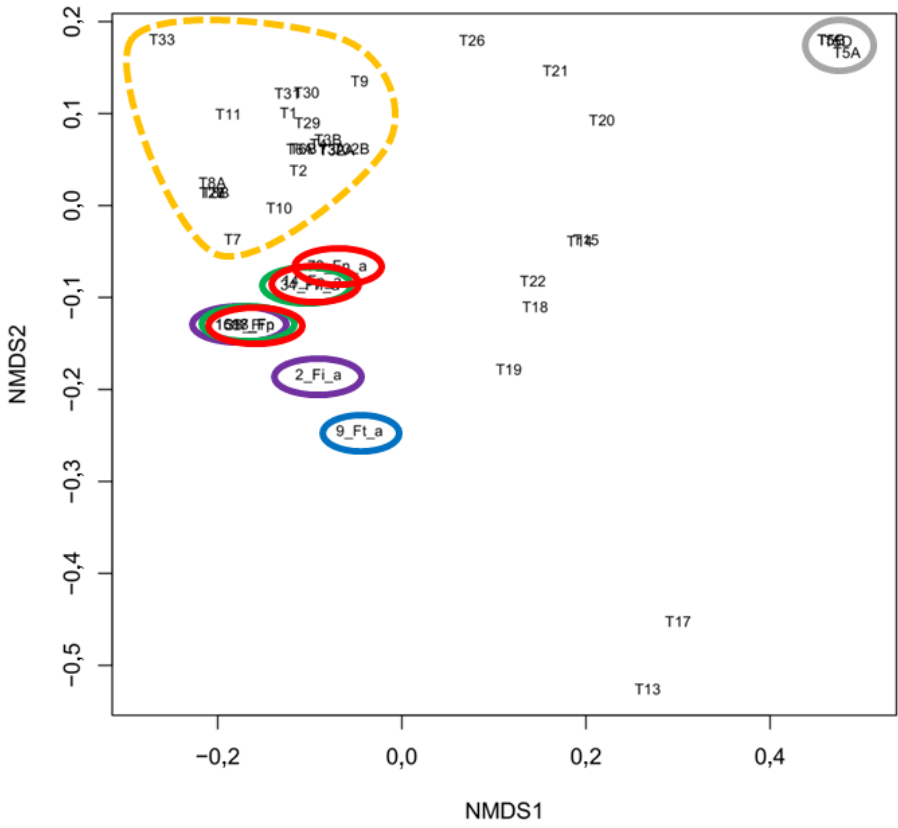
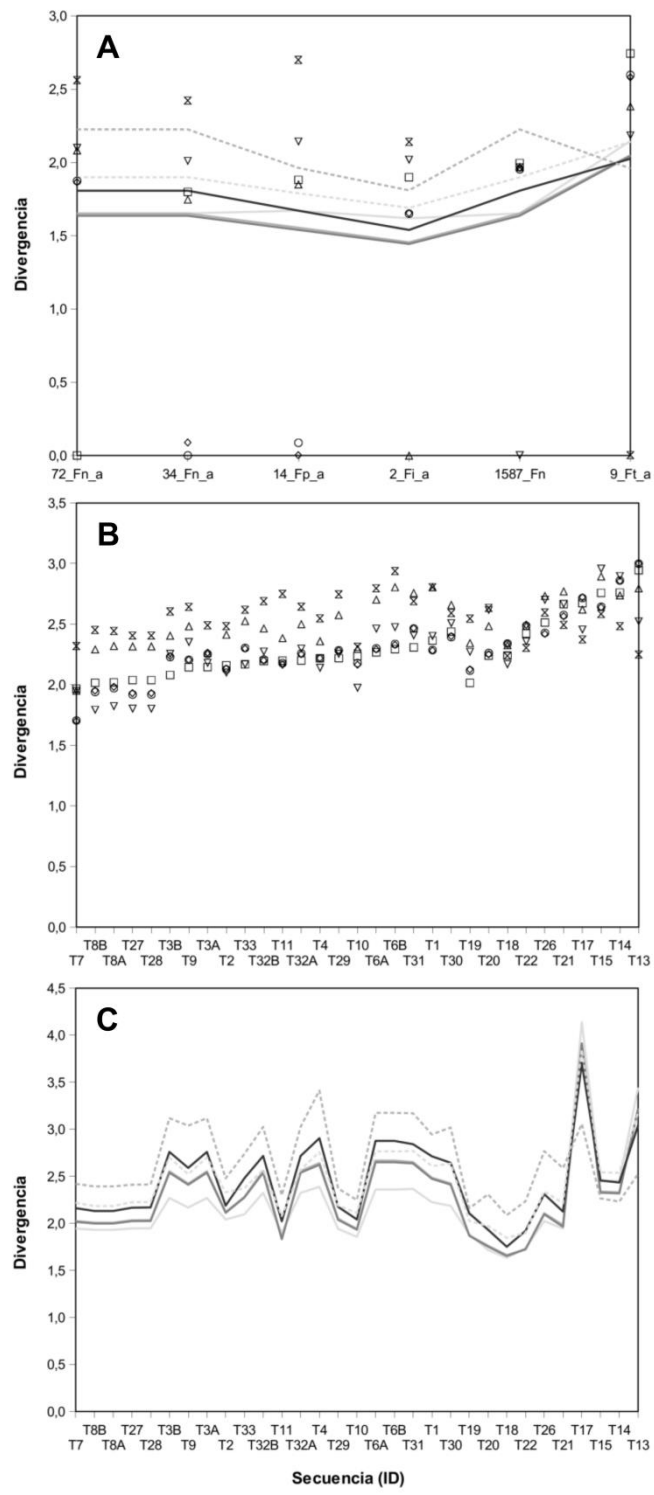


Figura 4.15.



**Tabla 4.6.**

**A**

ID	Número de acceso	Organismo	IR izquierda*	Identidad (%)
1544_Fn	YP_001411074	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	..... ..... ..... ..... .....  GATTTTGTTAAACCAAGGTAT TGA <76 bp>	95,8
500_Fn	YP_001410030:	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	.....G.....<76 bp>	100,0
414_Fn	YP_001409944	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	.....<76 bp>	100,0
109_Fn	YP_001409639	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	.....<76 bp>	100,0
545_Fn	YP_001410075	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	.....AA.....T.A.....<77 bp>	83,3
34_Fn	YP_001409564	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	.....AA.....T.A.....<77 bp>	83,3
123_Fp	YP_005470405	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	.....<77 bp>	100,0
1383_Fn	YP_001410913	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	.....AA.....T.A.....<77 bp>	83,3
757_Fp	YP_005471039	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	.....AA.....T.A.....<77 bp>	83,3
1475_Fp	YP_005471157	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	.....GC.....T.A.....<80 bp>	83,3
2_Fi	KHG30988	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	.....GC.....T.A.....<80 bp>	83,3
3_Fi	KHG30989	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	.....GC.....T.A.....<80 bp>	83,3
4_Fi	KHG30990	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	.....GC.....T.A.....<80 bp>	83,3
7_Fi	KHG31081	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	.....GC.....T.A.....<80 bp>	83,3
23_Fi	KHG31897	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	.....GC.....T.A.....<80 bp>	83,3
21_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	-TA..C....-C.A..TA.<75 bp>	57,0
22_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	-TA..C....-C.A..TA.<72 bp>	57,0
1_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	-TA..C....-T.AA..TA...-<bp>	53,5
2_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	-TA..C....-C.A..TA...<76 bp>	57,0
12_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	-TA..C....-C.A..TA...<303 bp>	57,0
6_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	-TA..C....-T.AA..TA...<311 bp>	53,5
27_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	-TA..C....-T.AA..TA...-<bp>	53,5
9_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	ND	-
16_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	ND	-
1587_Fn	YP_001411117	<i>Fervidobacterium nodosum</i> R117-B1	-TA..C....-G.TAAA..TA...<75 bp>	46,4
1618_Fp	YP_005471900	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	-TA..C....-G.TAAA..TA...<75 bp>	46,4
33_Fi	KHG32387	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	-TA..C....-G.TAAA..TA...<75 bp>	46,4
T1	WP_004456585	<i>Clostridium perfringens</i>	-C..C....-.AA.A...<80 bp>	53,5
T6a	YP_698127	<i>Clostridium perfringens</i> SM101	-C..C....-.AA.A...<80 bp>	53,5

(continúa)

Accession	Species	Strain	Gene	Position	Sequence	Length
T68	<i>Clostridium perfringens</i>	SM101			...C...C.T...--..AA.A...<80 bp>	50.0
T30	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	N1-4(HMT)			...C...C...--..A.TA...<79 bp>	53.5
T31	<i>Clostridium tetani</i>	E88			...C...C.A...--..AA.TA...<79 bp>	48.2
T29	<i>Clostridium botulinum</i>	C str. Eklund			...C...C...--..A.TA...<79 bp>	53.5
T4	<i>Clostridium botulinum</i>	BKT015925			...C...C...--..A.TA...<79 bp>	53.5
T38	<i>Clostridium botulinum</i>	BKT015925			...C...C...--..A.TA...<79 bp>	53.5
T3A	<i>Clostridium botulinum</i>	BKT015925			...C...C...--..A.TA...<79 bp>	53.5
T32A	<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM795			A...C...--..A.TA...<79 bp>	53.5
T32B	<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM795			A...C...--..A.TA...<79 bp>	53.5
T9	<i>Clostridium bartlettii</i>	DORA_8_9			...C...TT.TTTA.A.TT...<- bp>	57.0
T10	<i>Natranaerobius thermophilus</i>	JW/INM-WN-LF			A...C...--..A.TA...<80 bp>	53.5
T7	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	str. A3			...C...A...C...AA.A...<- bp>	50.0
T28	<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	subsp. <i>Finnii</i> Ako-1			...C...A...C...AA.A...<78 bp>	50.0
T27	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	ATCC 33223			...C...A...C...AA.A...<78 bp>	50.0
T8A	<i>Thermoanaerobacter italicus</i>	Ab9			...C...A...C...AA.A...<78 bp>	50.0
T8B	<i>Thermoanaerobacter italicus</i>	Ab9			...C...A...C...AA.A...<78 bp>	50.0
T11	<i>Clostridium clariflavum</i>	DSM 19732			...C...C...A...C...AA.A...<77 bp>	42.8
T15	<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	GV50			G...C.CC.T.TT.T...G...C...C...<92 bp>	48.0
T14	<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	BAV1			G...C.CC.T.TT.T...G...C...C...<92 bp>	48.0
T19	<i>Photobacterium leiognathi</i>	livu.4			G.GC...G...AAA...<47 bp>	44.0
T17	<i>Parvularcula bermudensis</i>	HCC2503			G.GG.C.T.G...GT.T...GGATCT...<40 bp>	28.5
T13	<i>Roseobacter denitrificans</i>	Och 114			G.GG.C...G...T.TAA.CT...<48 bp>	29.1
T18	<i>Sireptococcus parauberis</i>	KRS-02083			G...C...G...T.TAAA...<48 bp>	51.7
T22	<i>Enterococcus faecium</i>	EnGen0149			G...C...G...T.TAAA...<51 bp>	51.7
T20	<i>Bacillus cereus</i>	VD184			AA.G.C.G...A.T...<72 bp>	39.2
T5B	<i>Thermotoga thermarum</i>	DSM 5069			G.GG...C...T.TA.AGCCGG...<57 bp>	35.7
T5C	<i>Thermotoga thermarum</i>	DSM 5069			G.GG...C...T.TA.AGCCGG...<57 bp>	35.7
T5A	<i>Thermotoga thermarum</i>	DSM 5069			G.GG...C...T.TA.AGCCGG...<57 bp>	35.7
T5D	<i>Thermotoga thermarum</i>	DSM 5069			G.GG...C...T.TA.AGCCGG...<57 bp>	35.7

\* El sombreado indica el posible codón de inicio de la transposasa. No Detectada, ND.

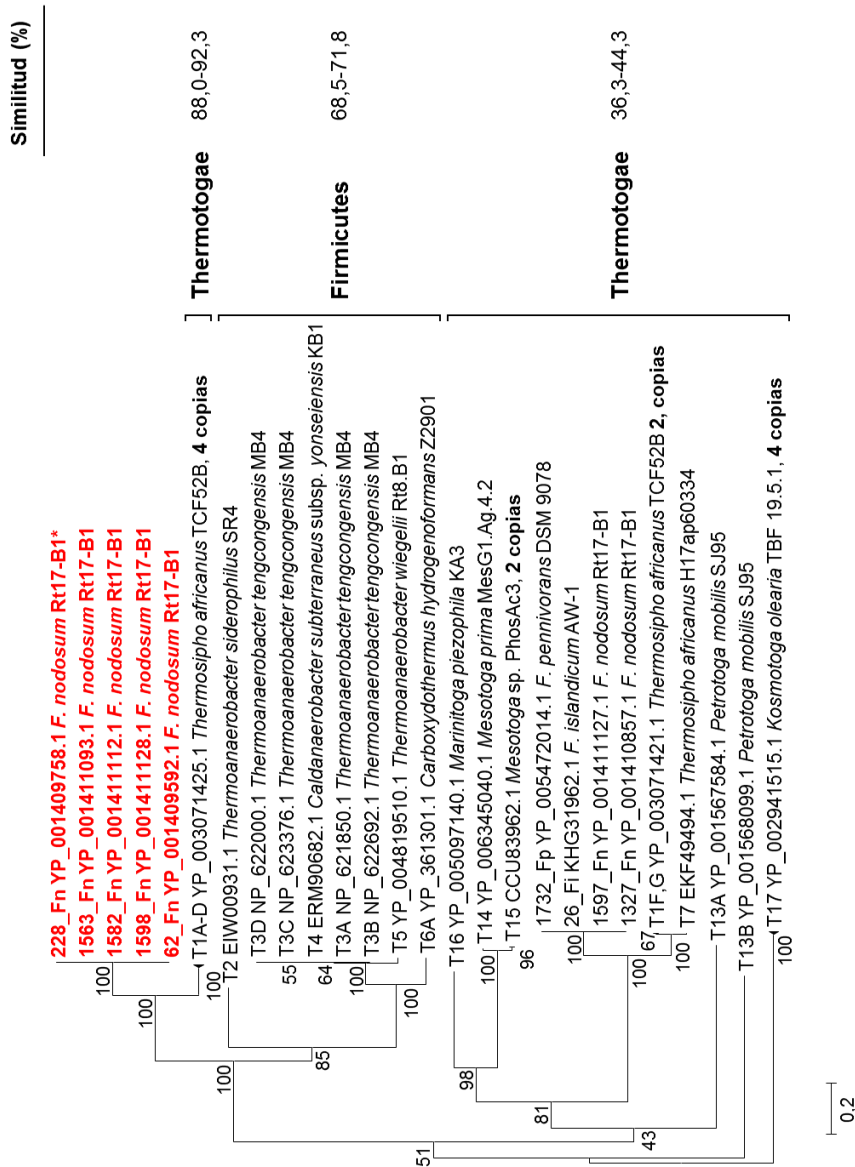


[illegible]

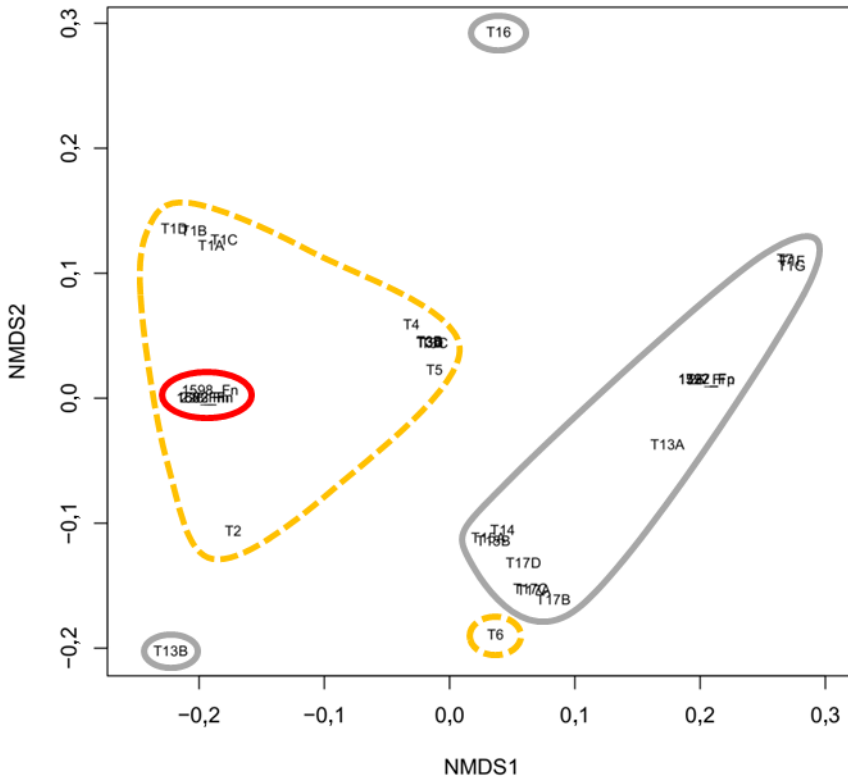
(Continuación de Tabla 4.6B)

T6B	ABG87019	<i>Clostridium perfringens</i> SM101	<130 bp>	...TA...A...AT...AT...	61,5
T30	YP_007456128	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4(HMT)	<131 bp>	...TA...AG...AT...	57,6
T31	NP_781088	<i>Clostridium tetani</i> E88	<130 bp>	...TA T...AT...	61,5
T29	WP_003363890	<i>Clostridium botulinum</i> C str. Eklund	<125 bp>	...AATT...A...A.C...	51,8
T4	YP_004397259	<i>Clostridium botulinum</i> BKT015925	<150 bp>	...AATT...A...A.C...	51,8
T3B	YP_004396627	<i>Clostridium botulinum</i> BKT015925	<150 bp>	...AATT...A...A.C...	51,8
T3A	YP_004395725	<i>Clostridium botulinum</i> BKT015925	<152 bp>	...AATT...A...A.C...	51,8
T32A	KCZ67209	<i>Clostridium sporogenes</i> DSM795	<150 bp>	...AATT...CA.C.AA	48,2
T32B	KCZ67173	<i>Clostridium sporogenes</i> DSM795	<150 bp>	...AATT...TA.C.AA	48,2
T9	ET196953	<i>Clostridium bartlettii</i> DORA_8_9	<119 bp>	...A...T...AA.C...	66,6
T10	YP_001916224	<i>Natranaerobius thermophilus</i> JW/NM-WN-LF	<137 bp>	...A...A...G.T.TA...	41,6
T7	YP_003677222	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i> str. A3	<189 bp>	...GTTT...T...AAGC...	44,4
T28	YP_004185254	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> subsp. <i>Finnii</i> Ako-1	<198 bp>	...AATT...T...AAGC...	44,4
T27	YP_001664246	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> ATCC 33223	<198 bp>	...AATT...T...AAGC...	44,4
T8A	YP_003476466	<i>Thermoanaerobacter italicus</i> Ab9	<198 bp>	...AATT...T...AAGC...	44,4
T8B	YP_003476272	<i>Thermoanaerobacter italicus</i> Ab9	<198 bp>	...AATT...T...AAGC...	44,4
T11	YP_005046189	<i>Clostridium clariflavum</i> DSM 19732	<172 bp>	...GTTT...G...T...AAGC...	40,7
T15	YP_008856417	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> GY50	<468 bp>	G...AC...T...TAA.GG.A.C...	40,7
T14	YP_001213639	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BAV1	<360 bp>	G...AC...T...TAA.GG.A.C...	40,7
T19	GAD28543	<i>Photobacterium leiognathi</i> Irivu.4	<38 bp>	...A.T.T.T.C...ATC.C...	34,6
T17	YP_003854447	<i>Parvularcula bermudensis</i> HTCC2503	<46 bp>	AG.CA.TC.AC.C...GC.C...	32,0
T13	YP_771766	<i>Roseobacter denitrificans</i> Och 114	<35 bp>	AGA.T...AT.C...ACC...	40,9
T18	EMG24341	<i>Streptococcus parauberis</i> KRS-02083	<31 bp>	...TTAA.AC.T.T.C...A...C...	41,3
T22	EOK87138	<i>Enterococcus faecium</i> EnGen0149	<31 bp>	...TTAA.AC.T.T.C...A...C...	41,3
T20	EOQ01568	<i>Bacillus cereus</i> VD184	<45 bp>	A.T.T.TT...C.C...A.C.TTT	27,5
T5B	YP_004660295	<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	<- bp>	T.CTTCT...G...G...C...	48,2
T5C	YP_004660538	<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	<- bp>	T.CTTCT...G...G...C...	48,2
T5A	YP_004659661	<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	<- bp>	T.CTTCT...G...G...C...	48,2
T5D	YP_004661042	<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	<- bp>	T.CTTCT...G...G...C...	48,2

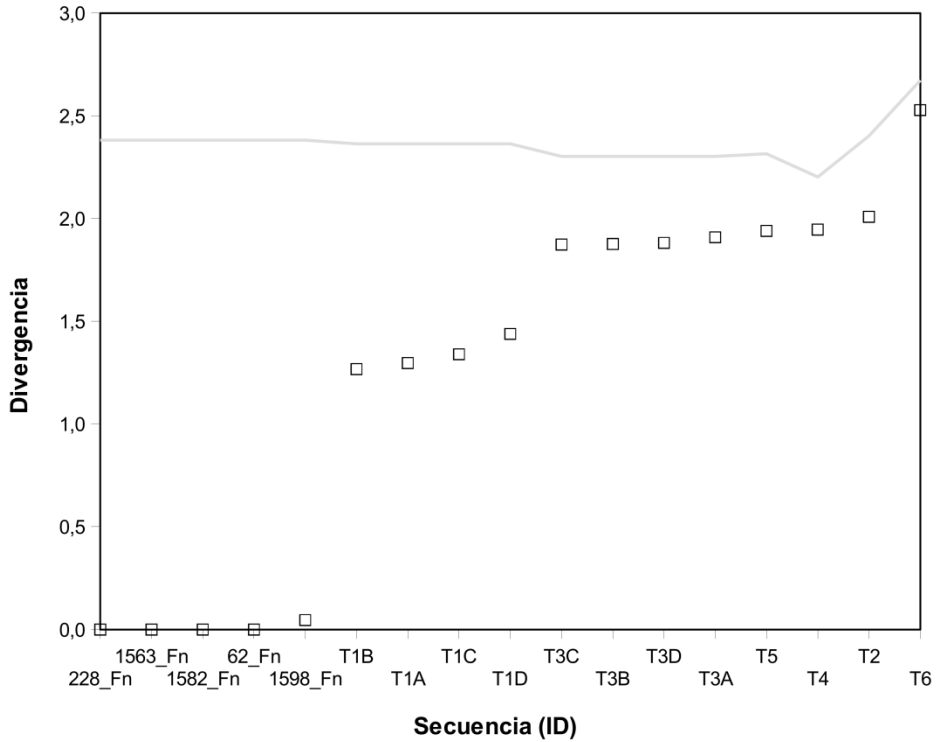
\* El sombreado indica el posible codón de terminación de la transposasa.



**Figura 4.16.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS110\_I de *F. nodosum* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) en *F. nodosum*.



**Figura 4.17.** Análisis multivariante (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para las secuencias de los genes del grupo de transposasas IS110\_I de *F. nodosum* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.16). Línea roja, *F. nodosum*; línea discontinua amarilla, Firmicutes; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.

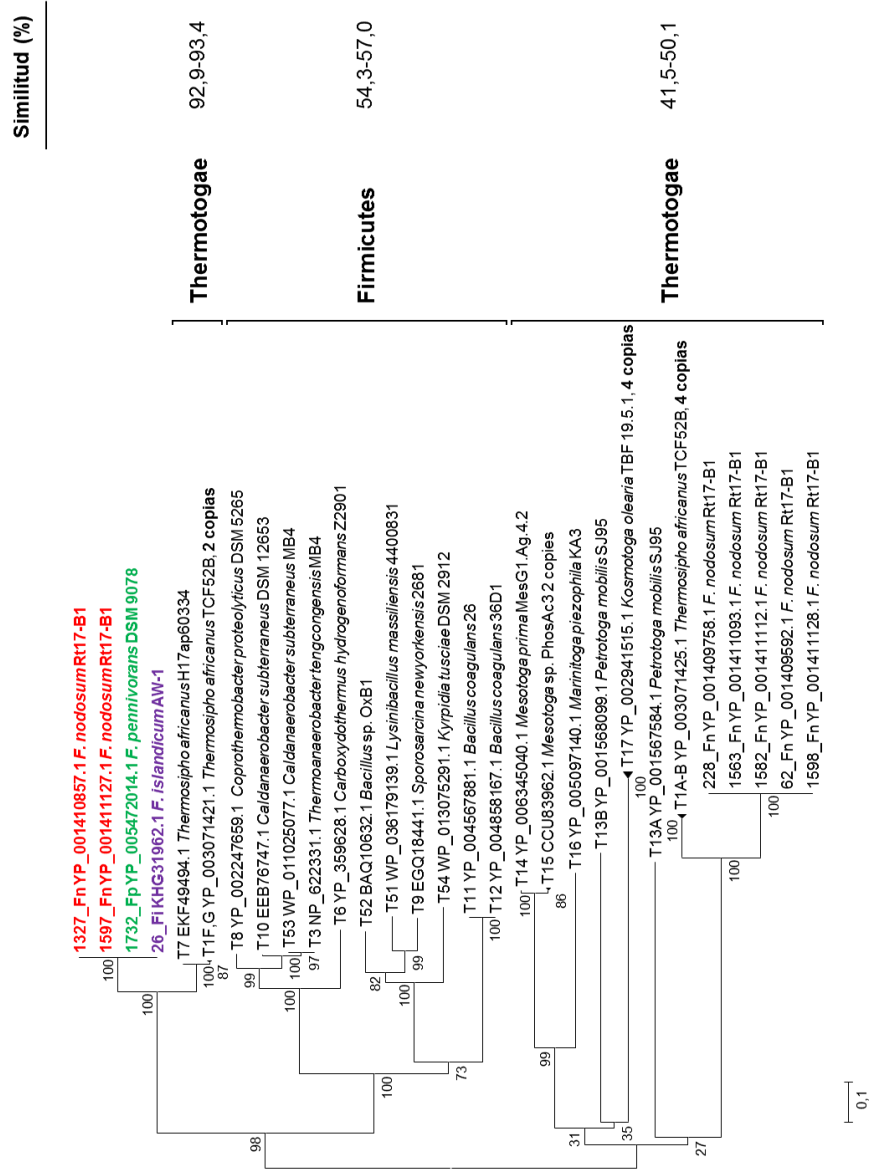


**Figura 4.18.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. nodosum* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS110\_I. Los cuadrados representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa 228\_Fn de *F. nodosum* en relación al genoma completo de cada especie. La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.16).



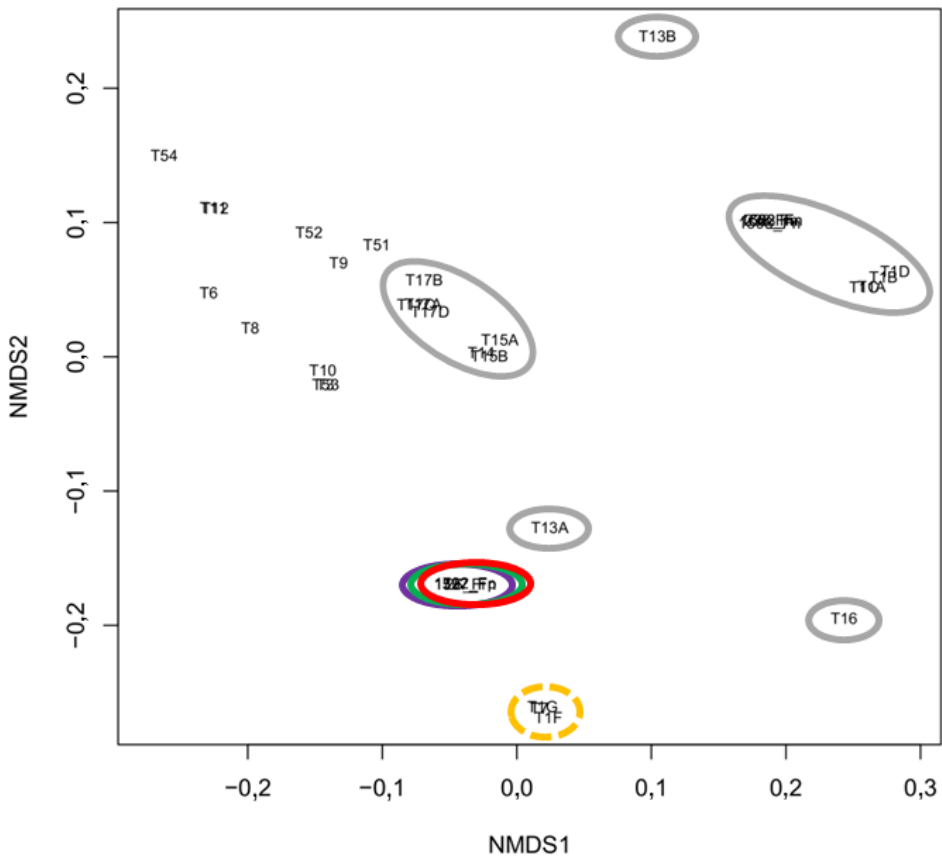


ID	Número de acceso	Organismo	IR derecha	Identidad (%)
228_Fn	YP_001409758	Fervidobacterium nodosum Rt17-B1	<305 bp> TT-TCAGGAGGCTA-A-TCAAAA-TATTTCTTTGAAGAGG-	100,0
1563_Fn	YP_001411093	Fervidobacterium nodosum Rt17-B1	<305 bp>	100,0
1582_Fn	YP_001411112	Fervidobacterium nodosum Rt17-B1	<305 bp>	100,0
1598_Fn	YP_001411128	Fervidobacterium nodosum Rt17-B1	<305 bp>	100,0
62_Fn	YP_001409592	Fervidobacterium nodosum Rt17-B1	<287 bp> GAA...TA.G.T-GAT...GT.T.CAA.G.CA.C....	50,0
T1A	YP_003071425	Thermosipho africanus TCF52B	<305 bp> ...A...TT	87,1
T1B	YP_003071401	Thermosipho africanus TCF52B	<310 bp> ...TT	89,7
T1C	YP_003071403	Thermosipho africanus TCF52B	<310 bp> ...TT	89,7
T1D	YP_003071422	Thermosipho africanus TCF52B	<310 bp> ...TT	89,7
T6A	YP_361301	Carboxydothemius hydrogenofomans Z-2901	<280 bp> ...TAAGA.CTTTAAATTAGTTAA....	40,0
T3B	NP_622692	Thermoanaerobacter tengcongensis MB4	<303 bp> ...T...A.CTTTGATTGACTAA.T.C....	42,2
T3A	NP_621850	Thermoanaerobacter tengcongensis MB4	<311 bp> ...T...A.CTTTGATTGACTAA.T.C....	42,2
T3C	NP_623376	Thermoanaerobacter tengcongensis MB4	<303 bp> ...T...A.CTTTGATTGACTAA.T.C....	42,2
T3D	NP_622000	Thermoanaerobacter tengcongensis MB4	<303 bp> ...T...A.CTTTGATTGACTAA.T.C....	42,2

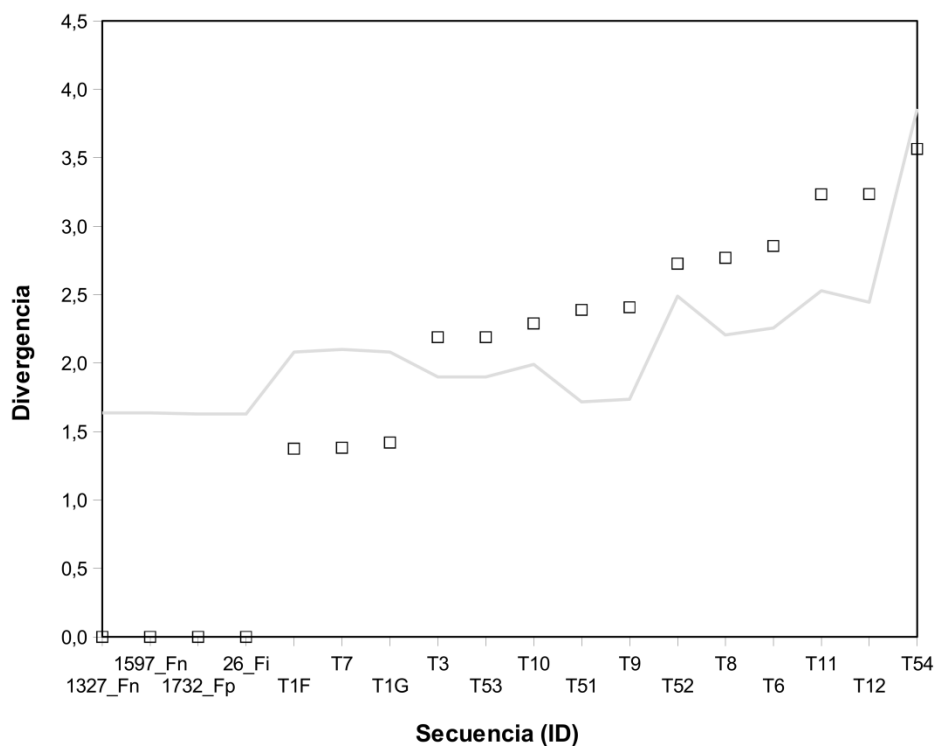


**Figura 4.19.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS110\_II de *Fervidobacterium* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a las secuencias de aminoácidos de las transposasas de *Fervidobacterium*.





**Figura 4.20.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para las secuencias de genes del grupo de transposasas IS110\_II de *Fervidobacterium* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.19). Línea roja, *F. nodosum*; línea verde, *F. pennivorans*; línea púrpura, *F. islandicum*; línea discontinua amarilla, *Thermosiphon*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.



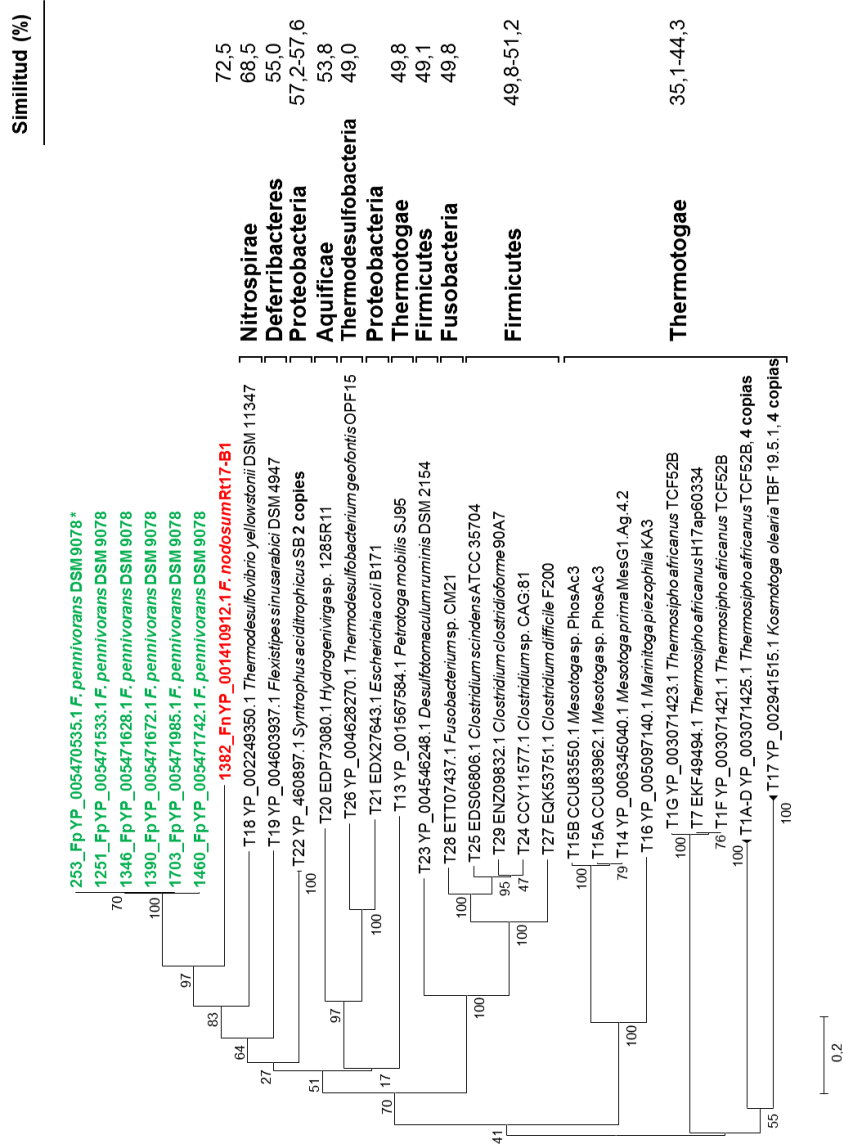
**Figura 4.21.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *Fervidobacterium* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS110\_II. Los cuadrados representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa 1327\_Fn de *F. nodosum* en relación al genoma completo de cada especie. La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.19).

**Tabla 4.8.** Secuencias situadas a ambos extremos de la IS de la familia de transposasas ISL3 detectada en *Ferriodobacterium* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las secuencias del extremo izquierdo (A) y del extremo derecho (B) de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de *Ferriodobacterium* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas

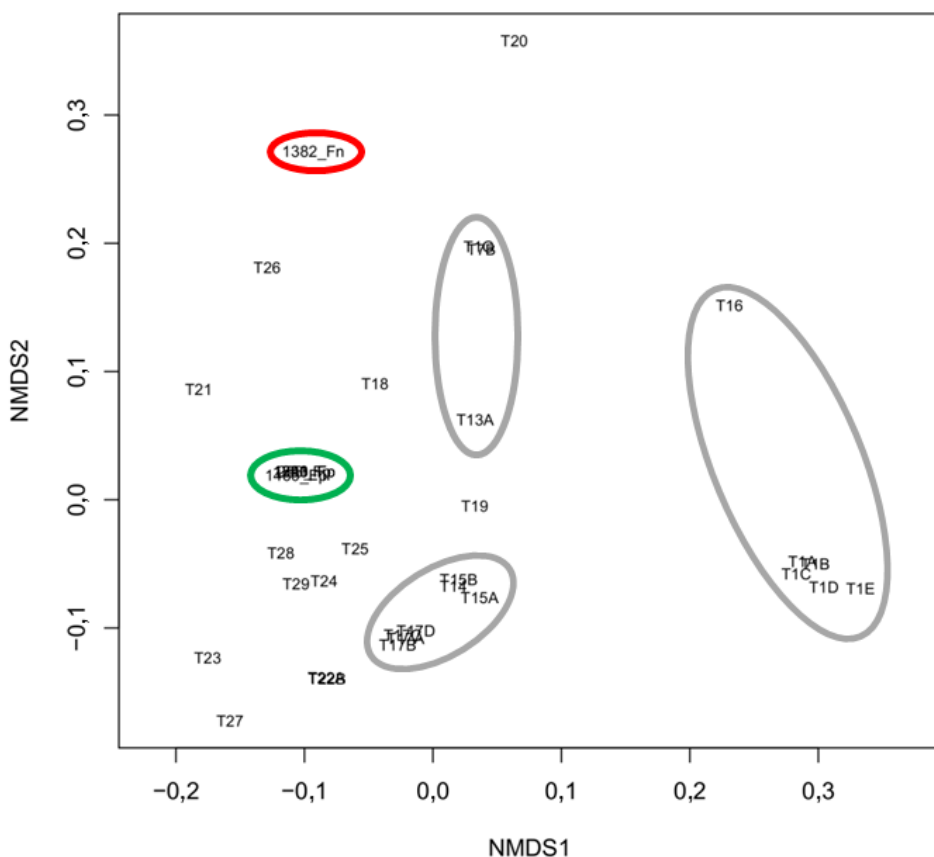
[illegible]



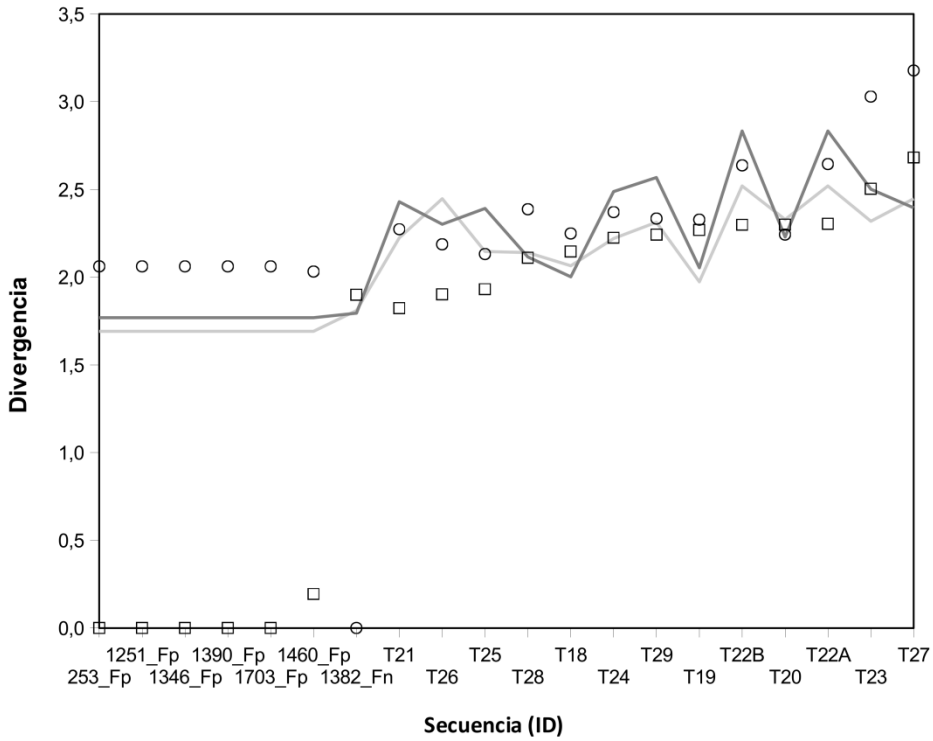
ID	Número de acceso	Organismo	Extremo derecho				Identidad (%)
			10	20	30	40	
1327_Fn	YP_001410857	<i>Fervidobacterium nodosum</i> RT17-B1	<77 bp>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
1597_Fn	YP_001411127	<i>Fervidobacterium nodosum</i> RT17-B1	<77 bp>	TTTTTAAATTTTCTAATTTTTCCTCTCTGACTTATTAACGGAAATCT-			
1732_Fp	YP_005472014	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	<77 bp>	.....			100
26_Fi	KHG31962	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	<77 bp>	.....			100
T7	EKF49494	<i>Thermosipho africanus</i> H17ap60334	<78 bp>	.....G.....C.C.A.CTCTTG.....C.....			76,5
T1F	YP_003071421	<i>Thermosipho africanus</i> TCF52B	<78 bp>	.....G.....C.C.A.CTCTTG.....C.....			76,5
T1G	YP_003071423	<i>Thermosipho africanus</i> TCF52B	<78 bp>	.....G.....C.C.A.CTCTTA.....A.....			76,5
T3	NP_622331	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	<92 bp>	AA..T.A..TCCAA.....AAGG.A.....A.....TG.G...T			61,7
T10	WP_009609590	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> DSM 12653	<92 bp>	AA..T.A..TCCAA.....AAGG.A.....A.....TG.G...T			61,7
T8	YP_002247659	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i> DSM 5265	<88 bp>	AA..T.A..TCCAG.....AGGG.A.....A.....TG.G...T			61,7
T6	YP_359628	<i>Carboxydothemus hydrogenoformans</i> Z-2901	<89 bp>	C.....C.AA.TCCA..C.TGGTC.....T.....TG.G...T			61,7



**Figura 4.22.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS110\_III de *Fervidobacterium* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. pennivorans*.



**Figura 4.23.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas IS110\_III de *Fervidobacterium* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.22). Línea roja, *F. nodosum*; línea verde, *F. pennivorans*; líneas continuas en gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.



**Figura 4.24.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *Fervidobacterium* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS110\_III. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *Fervidobacterium*, en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 253\_Fp (cuadrados; línea gris claro) y 1382\_Fn (círculos; línea gris oscuro). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.22).

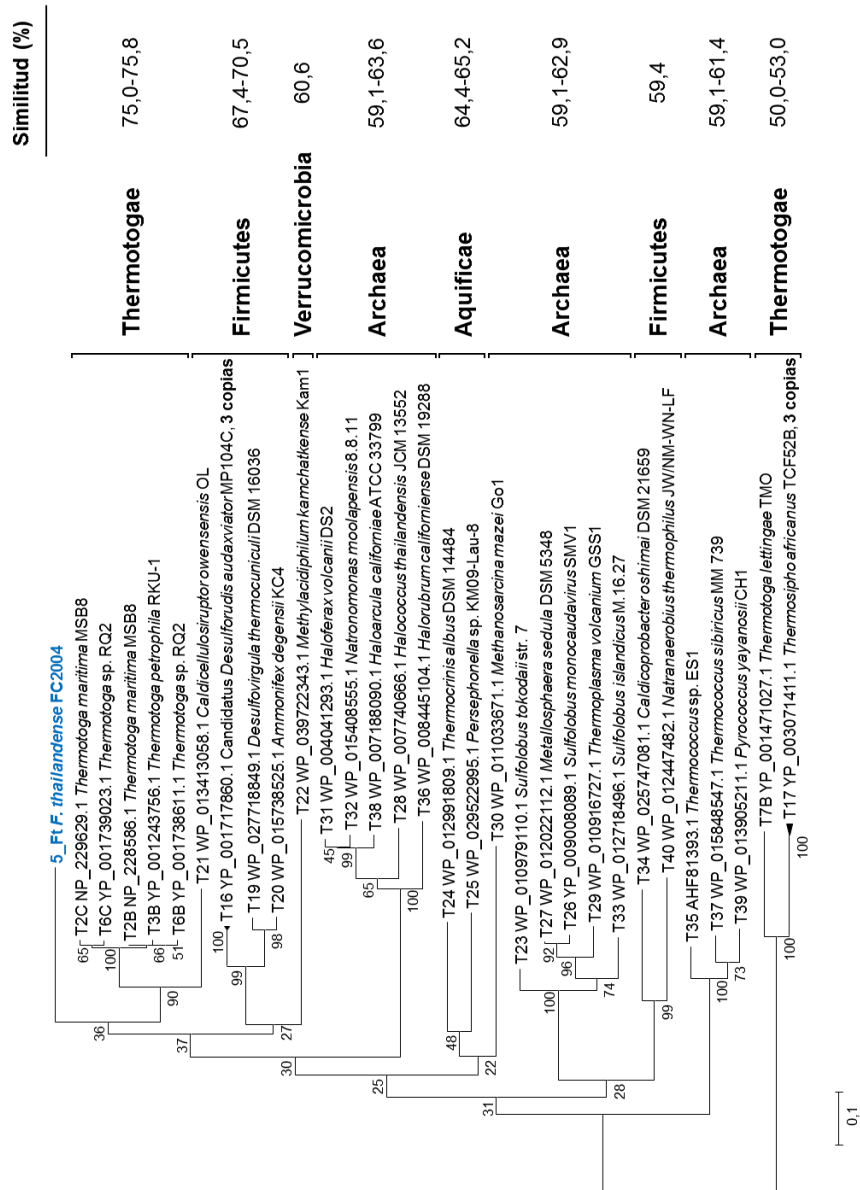




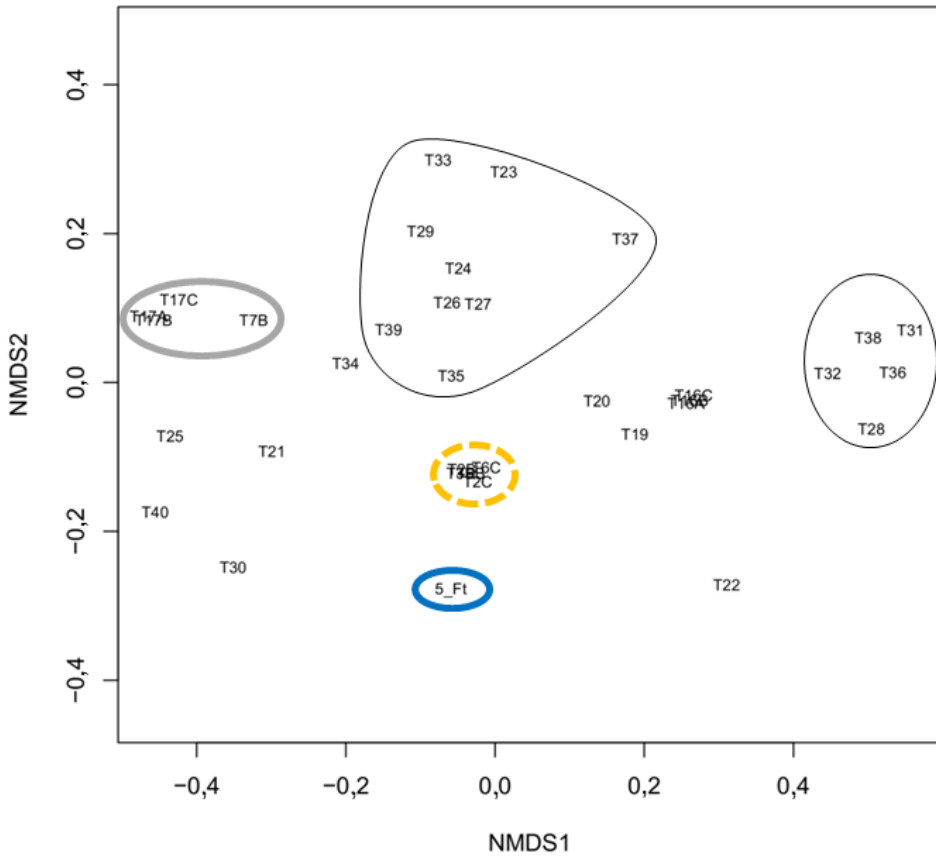
B

ID	Número de acceso	Organismo	Extremo derecho										Identidad (%)
				10	20	30	40	50					
253_Fp	YP_005470535	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp>	CGA <b>T</b> CA <b>T</b> ACATTT <b>TC</b> CT <b>T</b> CTAC <b>CA</b> AAAT <b>T</b> -T-AA <b>TTT</b> TAC <b>TA</b> GT <b>G</b> ACTCC <b>CG</b> T									100,0
1251_Fp	YP_005471533	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp>										
1346_Fp	YP_005471628	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp>										98,2
1390_Fp	YP_005471672	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp>										100,0
1703_Fp	YP_005471985	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp>										98,2
1460_Fp	YP_005471742	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	<211 bp>										98,2
1382_Fn	YP_001410912	<i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1	<304 bp>	TAT <b>G</b> ...TG...G...A...TC...A...C...C...G...T...C...A...T...T...									50,8
T18	YP_002249350	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> DSM 11347	< - bp>	TT <b>C</b> ...TTG <b>CC</b> ...AC <b>A</b> ...G...T <b>CT</b> ...GGAGG...GC...T...T...A...									56,8
T19	YP_004603937	<i>Flexistipes sinusarabici</i> DSM 4947	< - bp>	TT <b>TG</b> ...T <b>TAC</b> ...ACAAAAGAG <b>A</b> ...TT <b>T</b> ...CG <b>T</b> ...AA <b>T</b> ...T...T...									38,9
T20	WP_008289549	<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	< - bp>	TT...ATAGG <b>CA</b> A...T...T...A...TCC...CT <b>T</b> ...CTA...C...T...									54,2
T26	YP_004628270	<i>Thermodesulfobacterium geofontis</i> OPF15	< - bp>	TT <b>CT</b> ...GGAGG <b>TCTC</b> ...C <b>TGTTT</b> ...CC...T...CCTG...T...T...									44,8
T21	WP_001106093	<i>Escherichia coli</i> B171	< - bp>	TT <b>TTCT</b> ...TTGCGAGG...TC...C <b>TG</b> ...TT <b>A</b> ...CC...T...CCTG...T...T...									46,5
T22A	YP_460897	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	< - bp>	TGA...CGACG <b>GACAACT</b> ...T...G...C...C...GA...G...C...TG...GAAA-									45,6
T22B	YP_460957	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	< - bp>	TGA...CGACG <b>GACAACT</b> ...T...G...C...C...GA...G...C...TG...GAAA-									45,6

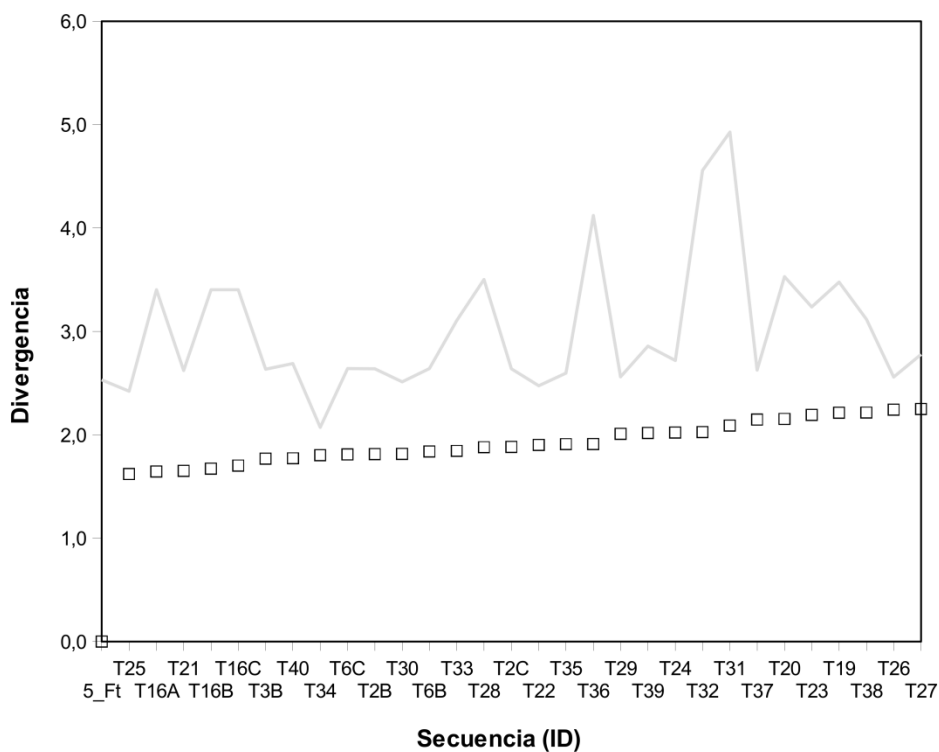
Las secuencias subrayadas representan posibles IRs. El sombreado indica el posible codón de terminación de la transposasa.



**Figura 4.25.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS200\_I de *Fe. thailandense* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de *F. thailandense*.



**Figura 4.26.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia del gen del grupo de transposasas IS200\_I de *F. thailandense* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.25). Línea continua azul, *F. thailandense*; línea discontinua amarilla, *Thermotoga*.; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae; línea continua negra, secuencias de arqueas detectadas en el análisis filogenético.

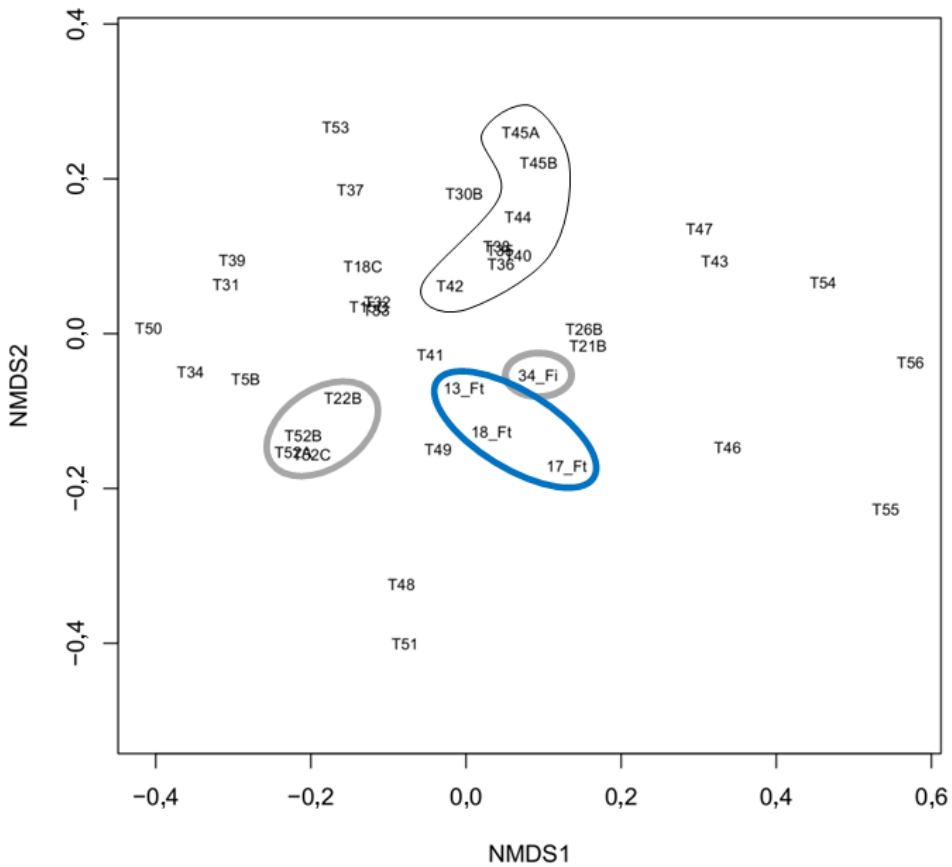


**Figura 4.27.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. thailandense* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS200\_I. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa de *F. thailandense* en relación al genoma completo de cada especie. La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.25).

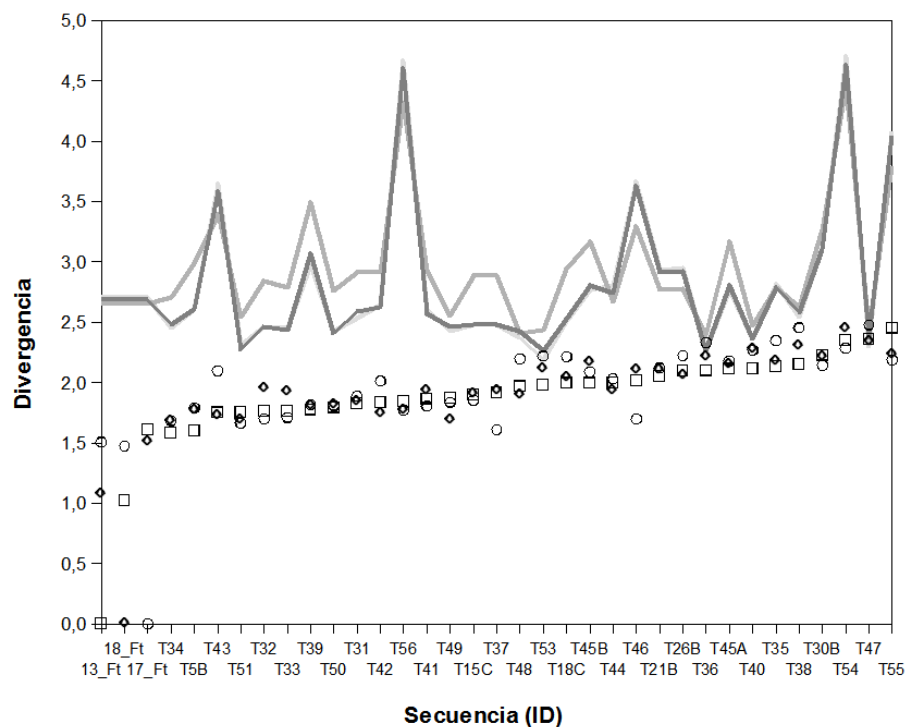
**Tabla 4.10.** Secuencias repetitivas situadas en el extremo izquierdo de la IS del grupo de transposasas IS200\_I detectado en *F. thailandense* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las secuencias palindrómicas del extremo izquierdo de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de *F. thailandense* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas.

ID	Número de acceso	Organismo	Extremo izquierdo	Identidad (%)
5_Ft	LWAF01000000	Fervidobacterium thailandense FC2004	..... ..... ..... ..... ..... ..... TGACAGAGA <b>TTTGTTCAGGCCTCCTCCCTTA</b> GGGGGAATAAAG <50 bp> <b>CCTCAAGTTC</b> ← →	
T2B	NP_228586	Thermotoga maritima MSB8	.....CCCCAACCAAG-A...-CA..CC...C....-.G.	54,9
T3B	YP_001243756	Thermotoga petrophila RKU-1	.....CCCCAACCAAG-A...-CA..CC...C....-.G.	54,9
T6B	YP_001738611	Thermotoga sp. RQ2	.....CCCCAACCAAC-TA--A..CC...C....-.G.	52,9
T2C	NP_229629	Thermotoga maritima MSB8	.....CCCCAACCAAC-TA--A..C...C....-.G.	54,9
T6C	YP_001739023	Thermotoga sp. RQ2	.....CCCCAACCAACCG-A...-A.TCC...C....-.G.	54,9
T16B	YP_001717033	Candidatus Desulfuridis audaxviator MP104C	.T.A..TCGC...CGG.-A..A.C.G.CC...C....-C..GG.T.><	50,9
T16C	YP_001717717	Candidatus Desulfuridis audaxviator MP104C	.T.A..TCGC...CGG.-A..A.C.G.CC...C....-C..GG.G.><	50,9
T16A	YP_001717860	Candidatus Desulfuridis audaxviator MP104C	.T.A..TCGC...CGG.--A..A.C.G.CC...C....-C..GG.G.><	50,9
T7B	YP_001471027	Thermotoga lettingae TMO	.T.ACA.GA.A.CCGACAAGA-.T...CA.CTTTA.AGAA.AT...TG..T<59 bp>	37,7
T17C	YP_003071398	Thermosiphio africanus TCF52B	.T.TCA..ATAAAGCAAATA-.A...CA.CTTTC.ATAG.AT...GG..T<61 bp>	35,8
T17A	YP_003071411	Thermosiphio africanus TCF52B	.T.TC...ATAAAGCAAAGA-.A...CA.CTTTC.ATAA.AT...TG..T<62 bp>	37,7
T17B	YP_003071389	Thermosiphio africanus TCF52B	.T.TC..ATAAAGCAAAGA-.A...CA.CTTTC.ATAA.AT..T.TG..T<62 bp>	35,8





**Figura 4.29.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas IS200\_II de *F. thailandense* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.28). Línea continua azul, *F. thailandense*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae; línea continua negra, secuencias de arqueas detectadas en el análisis filogenético.



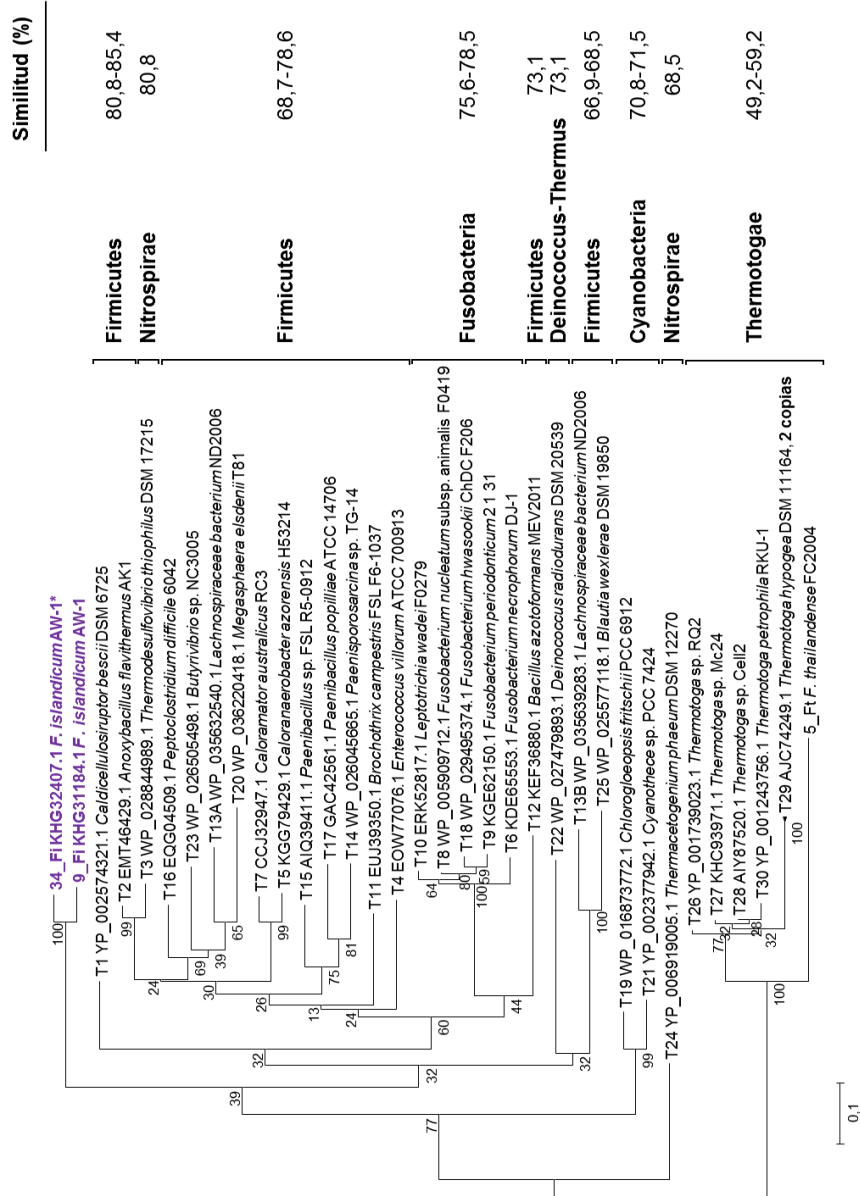
**Figura 4.30.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. thailandense* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS200\_II. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *F. thailandense* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 13\_Ft (cuadrados; línea gris más claro), 18\_Ft (rombos; línea gris oscuro), 17\_Ft (círculos; línea gris medio). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.28).



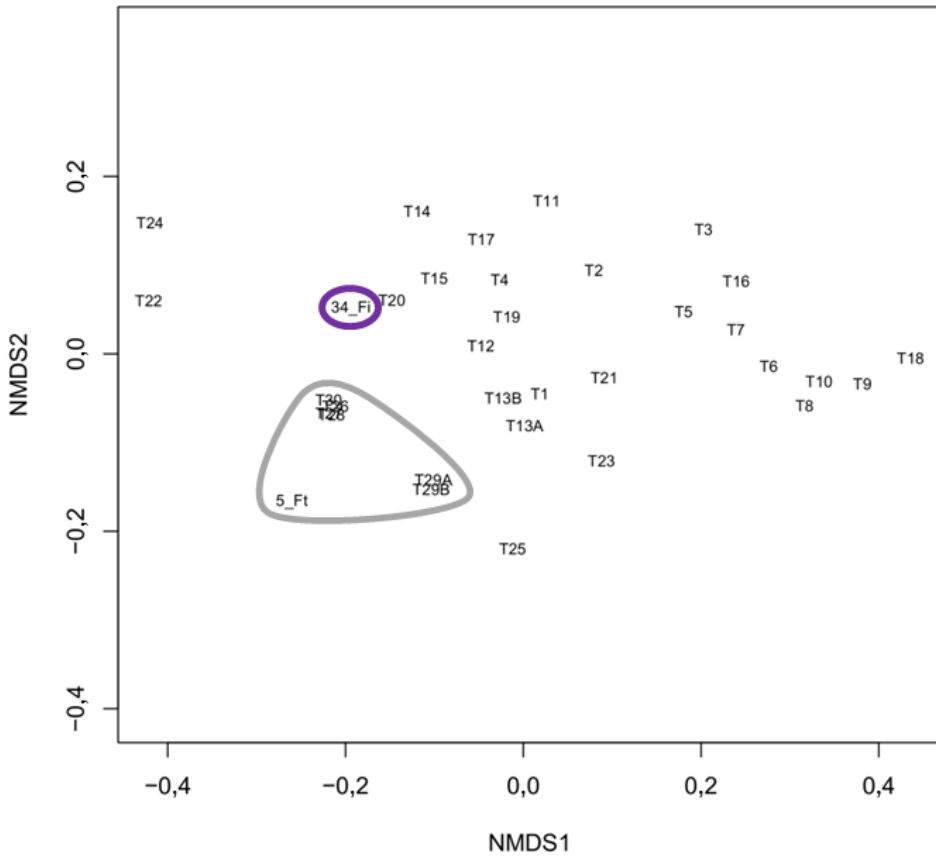
**Tabla 4.11.** Secuencias repetitivas situadas en el extremo izquierdo de la IS del grupo de transposasas IS200\_II detectado en *F. thailandense* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las secuencias palindrómicas del extremo izquierdo de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de la transposasa 13\_Ft de *F. thailandense* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas.

ID	Número de acceso	Organismo	Extremo izquierdo	Identidad (%)
17_Fl	LWAF01000000	Fervidobacterium thailandense FC2004	TTACAAA-TTGGAGGCTAAAGCCCGCACTTCAGTGGGGATACAGA<78 bp>	
18_Fl	LWAF01000000	Fervidobacterium thailandense FC2004	. . . G . . . A . A . CT . T . . . . . <83 bp>	82,6
13_Fl	LWAF01000000	Fervidobacterium thailandense FC2004	. . . G . . . A . T . . . TTT . . . . . <73 bp>	84,6
T30B	YP_003473530	Thermococcus albus DSM 14484	ATT.T.G.AAC.CG. . . . . AT.T.T.ATGA. . . . . C <65 bp>	66,0
T31	WP_029522995	Persephonella sp. KM09-Lau-8 strain KM09_Lau8	.T.T.G.AA.TTC. . . . . ATTG. A.CMAT. . . . . G <97 bp>	60,7
T47	YP_007946343	Desulfotomaculum gibsoniae 7213	ND*	-
T41	YP_007301769	Methanomethyllovorans hollandica DSM 15978	ND	-
T49	YP_006922341	Methanolobus psychrophilus R15	GATACCTTAGGCACAAGGT.T.ATAA.TTTTG.A.CTATAA.T.GAT. . . . . <0 bp>	26,4
T26B	YP_001739023	Thermotoga sp. RQ2	G. . . G. . CCCAACCA.G. . . . . TATT.CC. . . . . GG.ATAGTTTT.T <45 bp>	40,0
T21B	YP_001243756	Thermotoga petrophila RKU-1	G. . . G. . CCCAACCA.G. . . . . ATC.CC. . . . . GG.ATAGTTTT.T <45 bp>	41,8
T43	YP_001717860	Candidatus Desulfuridis audaxviator MP104C	ATAA.AT.CGC. . CG. . . . . AG. . . GC.CC. . . . . GG.C.C.GAGG.A.<59 bp>	43,8
T37	YP_004003541	Caldicellulosiruptor owensensis OL	G. . . G. G.ATAG. . CCCGC.GC. . . . . A.T.TC. . . . . C.AAAT.GGT.A.<50 bp>	47,2
T53	YP_006995786	Anabaena sp. 90	AC.ACC.TTT.GATGTAA.G. . . . . TTGACTTCTCAATAATTT. . T. A. <40 bp>	29,8
T48	YP_002373319	Cyanotherce sp. PCC 8801	AG.AGCCGTATGA.ATCTA.ATAGTCTAG.ACGCCT.TCNAAG. . . . . <40 bp>	17,3
T46	YP_003589886	Kryptidia tusciae DSM 2912	. . . A.A. . CCCGAC. . G. . . . . A.CC. . . . . TAG.G.T.GATG.A.<57 bp>	45,4
T51	EESK3079	Bacillus cereus BGSC 8E1	. . . AGCCCTCCCGAAC.A.G. . . . . T.GC. . . . . TAG. A. . . GATG.A.<129 bp>	42,8
34_Fl	KHG32407	Fervidobacterium islandicum AW-1	. . G. . . G. . . C. AA. A. A. CTC.TGT.TTCAGCAT.A.TA.CAG.TAGT. <138 bp>	29,6
T22B	YP_001471027	Thermotoga leitingeri TMO	A. A. G. . . TCCGACA. AAG.T. . T. AT. . . . . ATAGAA.AT.GAGAT. . <61 bp>	35,7
T52C	YP_003071398	Thermosiphon africanus TCF52B	.AT.A.A.T.AAAGCAA.TAAG. . T. AT. . . . . TA.AG.AT.GAGAG. . <63 bp>	35,7
T52A	YP_003071411	Thermosiphon africanus TCF52B	.AT.G.A.T.AAAGCAA.AAG. . T. AT. . . . . TA.AA.AT.GAGAT. . <64 bp>	37,5
T52B	YP_003071389	Thermosiphon africanus TCF52B / H17ap60334	.AT.G.A.T.AAAGCAA.AAG. . T. AT. . . . . TA.AA.AT.GATAT. . <64 bp>	37,5

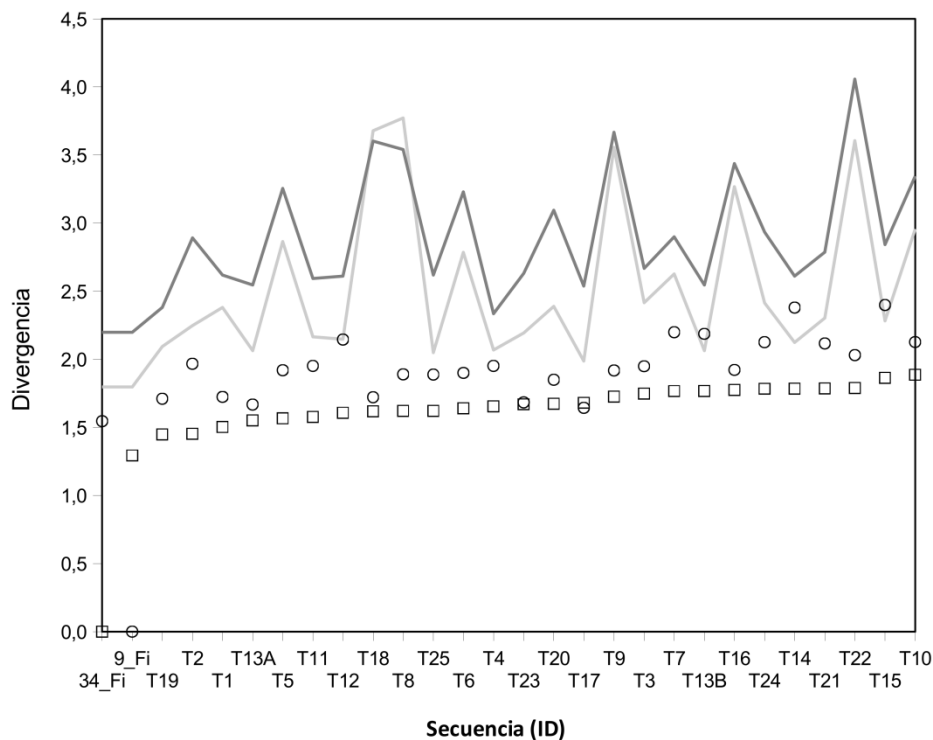
\* No detectada, ND



**Figura 4.31.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS200\_III de *F. islandicum* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. islandicum*.



**Figura 4.32.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas IS200\_III de *F. islandicum* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.31). Línea continua púrpura, *F. islandicum*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.



**Figura 4.33.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. islandicum* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS200\_III. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *F. islandicum* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 34\_Fi (cuadrados; línea gris claro), 9\_Fi (círculos; línea gris oscuro). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.31).

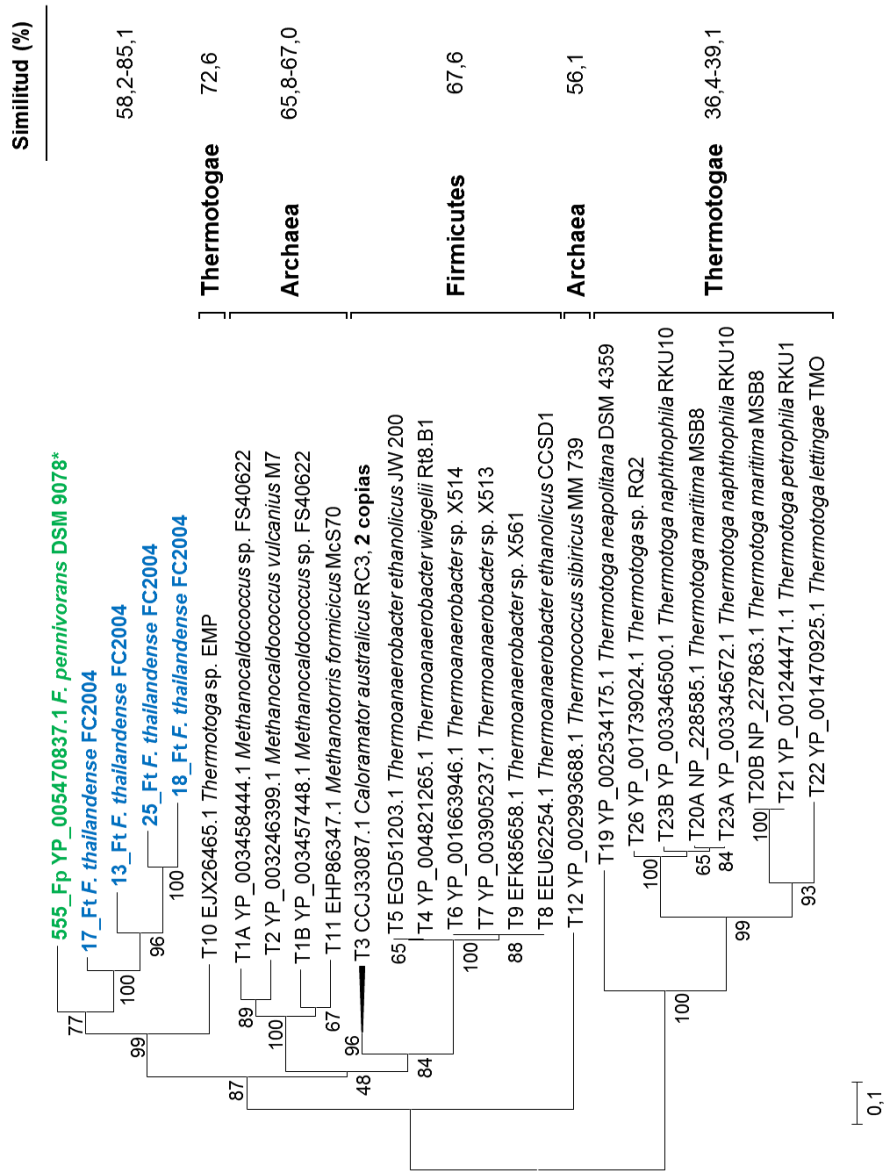
**Tabla 4.12.** Secuencias repetitivas situadas en el extremo izquierdo de la IS del grupo de transposasas IS200\_III detectado en *F. islandicum* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las secuencias palindrómicas del extremo izquierdo de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de la transposasa 34\_Fi de *F. islandicum* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas.

ID	Número de acceso	Organismo	Extremo izquierdo	Identidad (%)
34_Fi	KHG32407	<i>Ferriodobacterium islandicum</i> AW-1	TTGAAG - CTAAGA ACACCTCGGTGTC AGA CAT G AG TA CAGTAGTAGTC <134 bp>	96.2
9_Fi	KHG31184	<i>Ferriodobacterium islandicum</i> AW-1	.....C.....GG.....T<99 bp>	92.5
T1	YP_002574321	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725	.....AAT.....CACG TG.....T.....ATG GTT CAT <89 bp>	81.4
T2	EMT46429	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> AK1	.....AAAA..T..CGTC TG...T....A..T..T....A.G.ACGC..AA.<87 bp>	88.8
T3	WP_028844989	<i>Thermodesulfobrio thiophilus</i> DSM 17215	.....TAAT..T..CATCTTG AC..T.....A.....T.....A.G.A.GC..AG.<88 bp>	74.0
T4	EOW77076	<i>Enterococcus villorum</i> ATCC 700913	.....T..GGCAATGCCG..A.....A..T..T..G..G..A-G CGC.....<576 bp>	81.4
T5	KGG79429	<i>Caloranaerobacter azorensis</i> H53214	.....T.AAAA..CGTC--CG..A.....A..T..T.....A.G.ACGC.T.AAA<92 bp>	-
T8	WP_005909712	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i> F0419	ND	58.6
T9	KGE62150	<i>Fusobacterium periodonticum</i> 2_1_31	C.....AATT..TTAAGTG TGTAGA..A.....G..CT..C AC C.T.--GT.....CCGTGA <77 bp>	64.2
T10	ERX52817	<i>Leptotrichia wadei</i> F0279	.....T..AGTT..T..AGTTATGCCAGA..A..T..A..T..T..G..A..GA.T GGC..AT<65 bp>	62.0
T11	EUJ39350	<i>Brochothrix campestris</i> FSL F6-1037	G.GCTATTT..TTAACTAGCG GAGA..A....C.A..T..T..G..T..A..GA.TCGGC.T.CGG<124 bp>	71.4
T12	KEF36880	<i>Bacillus azotoformans</i> MEV2011	AAAGTTATTT..GTATATAGC CGAGA..C.....A..A..T.....A..GA.TCGGC.T.CGG<157 bp>	77.7
T13A	WP_035632540	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> ND2006	.....TTAA A..T..TG A--GCG..A.....A..T..T.....A..CG A--CGT<543 bp>	64.2
T14	WP_026045665	<i>Paenisporosarcina</i> sp. TG-14	--TCATTATGCTTCAGC CGAGA..A..T..A..T..T..G..A..GA.TCGGC.T.CGG<131 bp>	64.2
T15	AIQ39411	<i>Paenibacillus</i> sp. FSL R5-0912	.....TA...TT..AGTTTTCG..AA...A..T..T..G..A..T..T..G..A..C.T.CGG<131 bp>	

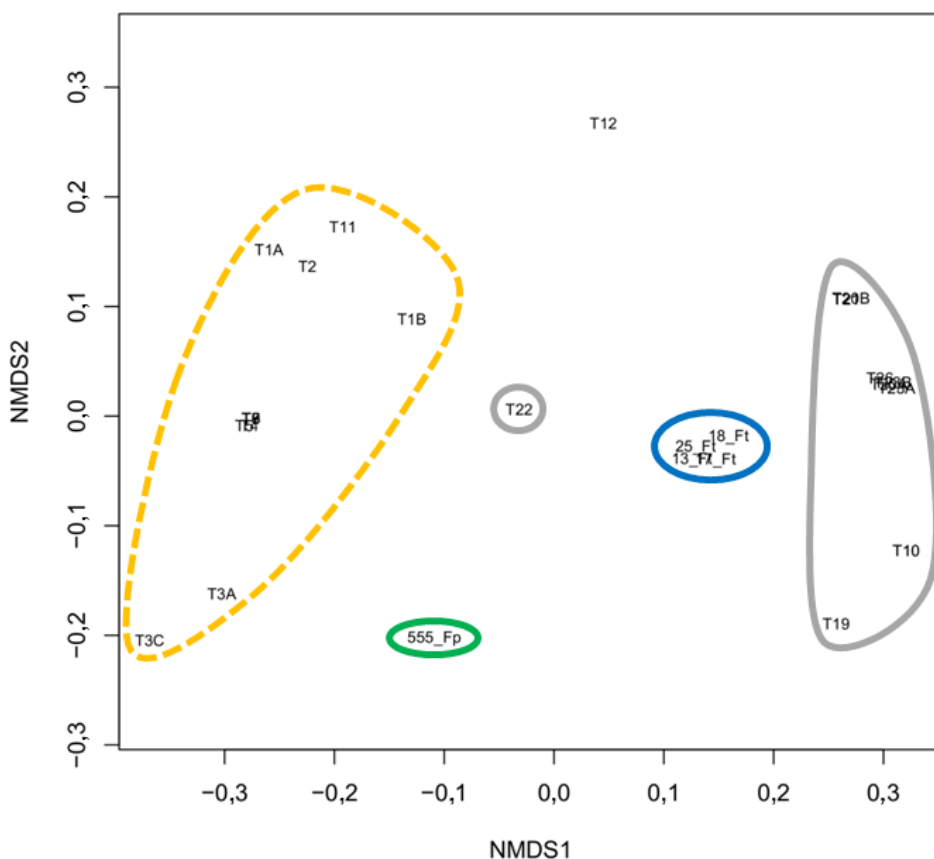
(Continuación de Tabla 4.12)

T18	WP_029495374	<i>Fusobacterium hwasookii</i> ChDC F206	ND	68,9
T19	WP_016873772	<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	...T.A...CGGGCG.CGG...A...A.T...T.A.T...G...T...G.C.CC.CG.GCAA<46 bp>	
T21	YP_002377942	<i>Cyanothoe</i> sp. PCC 7424	...TT.GA...CGGA.CG.CGG...A...TCG.T.CTA.G...T...G.C.C.CG...CAA<44 bp>	63,3
T22	WP_027479893	<i>Deinococcus radiodurans</i> DSM 20539	...GC.TTGAG.GGGCG...A...A...T...T...T...G.CCC.CT.CGCC.<68 bp>	82,1
T23	WP_026505498	<i>Butyrivibrio</i> sp. NC3005	...TAA.A...GCGAGCG...T.C...A...T...T...G...G.T...G...AGCA...A.G<92 bp>	67,8
T13B	WP_035639283	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> ND2006	...TAA...CG.GCG.CGG...T...T...A...T...T...G...T...G.C.CCGC...C.T<33 bp>	71,4
T25	WP_025577118	<i>Blautia wexlerae</i> DSM 19850	...TAA...GT.GCG.TCG...T...TA...T...G...T...GGC...C.C.T.T.T.<70 bp>	71,4
T26	YP_001739023	<i>Thermotoga</i> sp. RQ2	...CAG...CCCAACACACG.A.GCTATTCCC...GGGATAGGTT.GTTGTGGT...TAA.T<32 bp>	25,8
T27	KHC93971	<i>Thermotoga</i> sp. Mc24	...CAG...CCCCAACACATT.A.CTATCCCC...GGGATAGGTT.GTTGTGGT...TAA.T<32 bp>	22,5
T28	AIY87520	<i>Thermotoga</i> sp. Cell2	...CAG...CCCCAACACACG.A.GCTATTCCC...GGGATAGGTT.GTTGTGGT...TAA.T<32 bp>	25,8
T30	YP_001243756	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1	...CAG...CCCCAACACACG.A.GC.ATCCCC...GGGATAGGTT.GTTGTGGT...TAA.T<32 bp>	29,0
T29A	AJC74249	<i>Thermotoga hypogaea</i> DSM 11164	A...CAGA.A...TAGT.GTT.CTGCA.GC.CTTCCC...G.GGAT.GGTAGGAGC...T.TC..T<35 bp>	30,0
T29B	AJC73024	<i>Thermotoga hypogaea</i> DSM 11164	A...CAGA.A...TAGT.GTT.CCACA.GC.CTTCTC...G.GGAT.GGTAGGAGC...T.TC..T<35 bp>	30,0
T31A	YP_003071411	<i>Thermosiphon africanus</i> TCF52B	...T.TCGA...TAAAGCAAAG.A.GA...CATC...T.A.GAT.G...A.GAATT.GCA...T.G<51 bp>	40,6
T31B	YP_003071389	<i>Thermosiphon africanus</i> TCF52B	...T.TCGA...TAAAGCAAAG.A.GA...CATC...T.A.GAT.G...TA.GAATC.GCA...T.G<51 bp>	37,5
T32	EKF50202	<i>Thermosiphon africanus</i> H17ap60334	...T.TCGA...TAAAGCAAAG.A.GA...CATC...T.A.GAT.G...TA.GAATC.GCA...T.G<51 bp>	37,5
T31C	YP_003071398	<i>Thermosiphon africanus</i> TCF52B	...T.TCGA...TAAAGCAAAT.A.GA...CATC...T.T.G.GAT.G...AGGAATT.GCA...T.G<50 bp>	37,5

\*La zona sombreada se corresponde con la región utilizada para calcular los porcentajes de identidad. No detectada, ND.

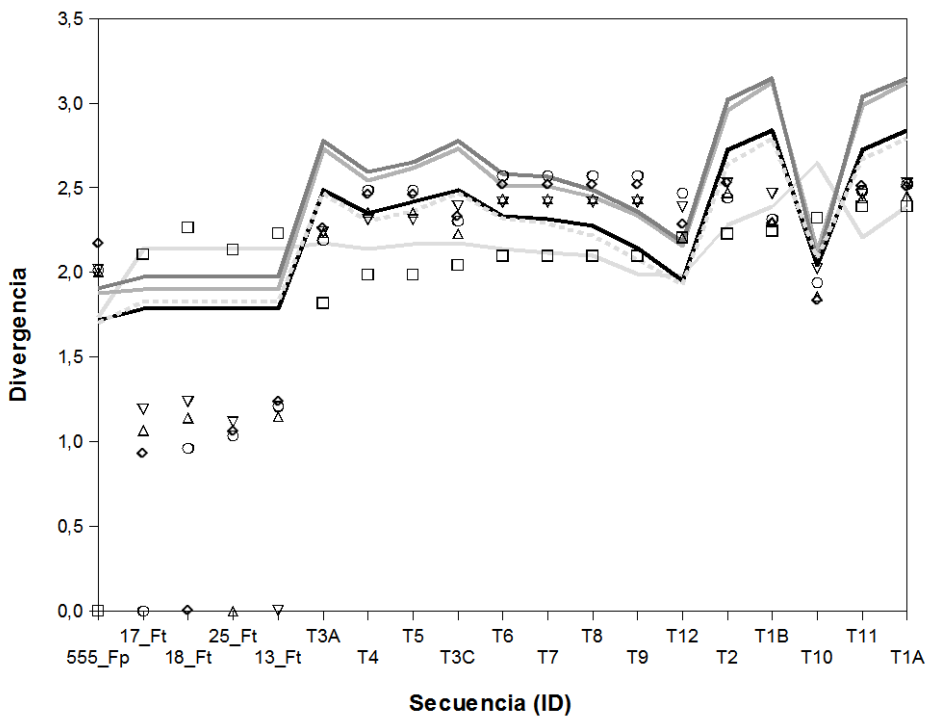


**Figura 4.34.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS605\_II de *Fervidobacterium* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de una de la transposasas de referencia (\*) de *F. pennivorans*.



**Figura 4.35.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas IS605\_II de *Fervidobacterium* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.34). Línea verde, *F. pennivorans*; línea azul, *F. thailandense*; línea discontinua amarilla, Firmicutes y Archaea; líneas continuas en gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.





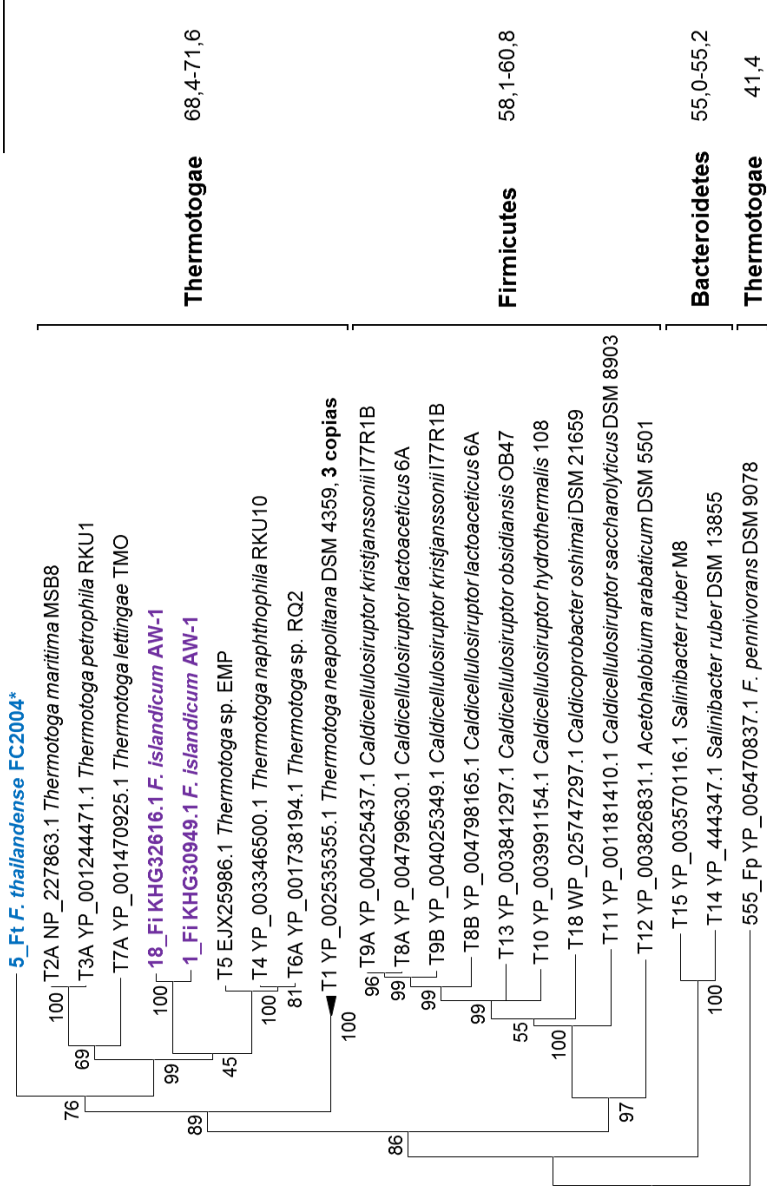
**Figura 4.36.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *Fervidobacterium* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS605\_II. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *Fervidobacterium* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 555\_Fp (cuadrados; línea gris claro), 17\_Ft (círculos; línea gris medio), 18\_Ft (rombos; línea gris oscuro), 25\_Ft (triángulos; línea negra) y 13\_Ft (triángulos invertidos; línea discontinua gris claro). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.34).

**Tabla 4.13.** Secuencias repetitivas situadas en el extremo derecho de la IS del grupo de transposasas IS605\_II detectado en *Fervidobacterium* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las secuencias palindrómicas del extremo derecho de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de la transposasa 555\_Fp de *F. pennivorans* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas. (Página siguiente) ►

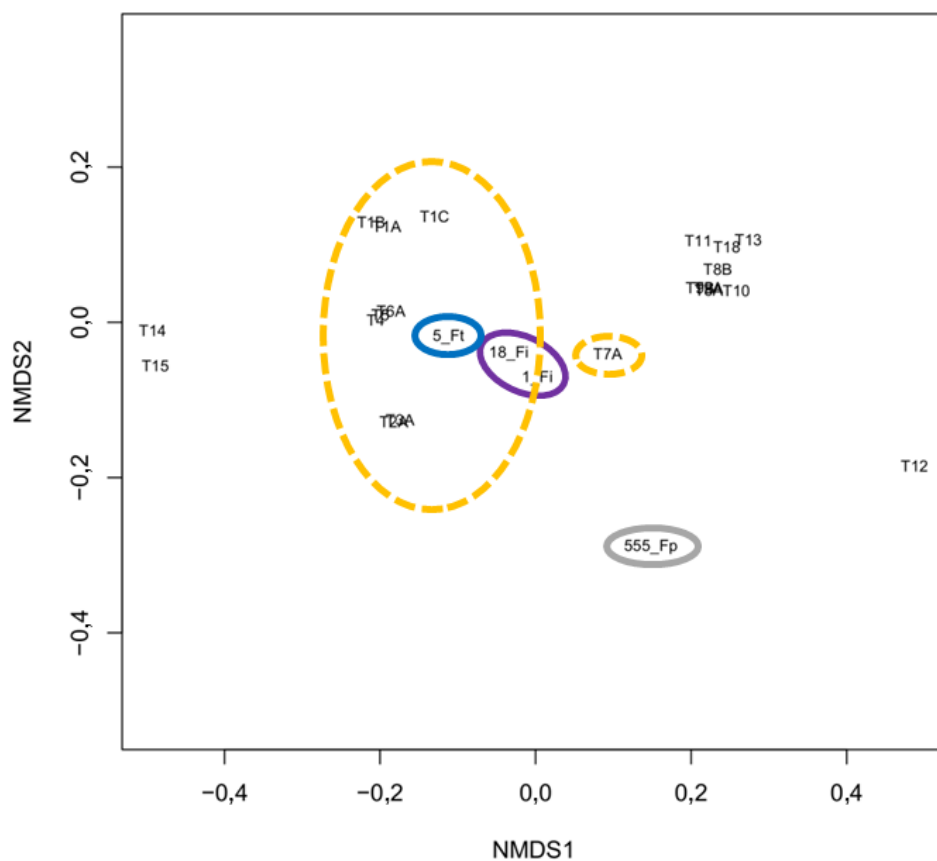
ID	Número de acceso	Organismo	Extremo derecho*	Identidad (%)
555_Fp	YP_005470837	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	<div><div>10203040</div><div>GAAGAA<b>TCC</b><b>TC</b>GC<b>ACTT</b>CAGTCGGGGAGTAGG<b>TCAA</b></div><div>→←</div></div>	<10 bp>94,5
25_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	<div><div>10203040</div><div>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....</div><div>→←</div></div>	<9 bp>86,4
17_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	<div><div>10203040</div><div>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>A</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<118 bp>94,5
18_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	<div><div>10203040</div><div>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>A</b>.....</div><div>→←</div></div>	<112 bp>89,1
13_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> FC2004	<div><div>10203040</div><div><b>G</b>.....<b>G</b>.....<b>T</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<118 bp>59,0
T10A	EJX26465	<i>Thermotoga</i> sp. EMP	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>CA</b>.....<b>C</b>CT.....<b>T</b>GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<11 bp>55,0
T1A	YP_003458444	<i>Methanocaldococcus</i> sp. FS406-22	<div><div>10203040</div><div><b>AG</b>.....<b>A</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>GG.....<b>T</b>.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....<b>T</b>.....</div><div>→←</div></div>	<0 bp>71,0
T1B	YP_003457448	<i>Methanocaldococcus</i> sp. FS406-22	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>A</b>.....<b>A</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>A</b>.....<b>A</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....</div><div>→←</div></div>	<- bp>68,4
T11	EHP86347	<i>Methanoterris formicicus</i> Mc-S-70	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>A</b>.....<b>A</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....<b>G</b>.....<b>T</b>.....</div><div>→←</div></div>	<24 bp>46,5
T3A	CCJ33087	<i>Caloramator australicus</i> RC3	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>TCC</b>.....<b>ACTT</b>.....<b>T</b>TAAG.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....<b>GGT</b>.....</div><div>→←</div></div>	<4 bp>51,1
T3C	WP_008907482	<i>Caloramator australicus</i> RC3	<div><div>10203040</div><div><b>AC</b>.....<b>AC</b>AA<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>GG</b>.....<b>T</b>.....<b>G</b>.....<b>GGT</b>.....</div><div>→←</div></div>	<5 bp>60,9
T4	YP_004821265	<i>Thermoanaerobacter wiegellii</i> R18.B1	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>TC</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>GA</b>.....<b>A</b>.....<b>GT</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<17 bp>60,9
T5	EGD51203	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW 200	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>TC</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>GA</b>.....<b>A</b>.....<b>GT</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<17 bp>60,9
T6	YP_001663946	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>TC</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>GA</b>.....<b>A</b>.....<b>GT</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<17 bp>60,9
T7	YP_003905237	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X513	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>TC</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>GA</b>.....<b>A</b>.....<b>GT</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<17 bp>60,9
T8	EEU62254	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> CCSD1	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>TC</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>GA</b>.....<b>A</b>.....<b>GT</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<17 bp>60,9
T9	EFK85658	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X561	<div><div>10203040</div><div><b>A</b>.....<b>TC</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>T</b>.....<b>GA</b>.....<b>A</b>.....<b>GT</b>.....<b>G</b>.....</div><div>→←</div></div>	<17 bp>53,3
T19	YP_002534175	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	<div><div>10203040</div><div><b>T</b>.....<b>A</b>.....<b>C</b>.....<b>TCC</b>.....<b>GAC</b>.....<b>C</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....<b>C</b>.....</div><div>→←</div></div>	<- bp>63,6
T26	YP_001739024	<i>Thermotoga</i> sp. RQ2	<div><div>10203040</div><div><b>C</b>.....<b>CA</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....</div><div>→←</div></div>	<7 bp>63,6
T23B	YP_003346500	<i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10	<div><div>10203040</div><div><b>C</b>.....<b>CA</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....</div><div>→←</div></div>	<7 bp>59,0
T20A	NP_228585	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	<div><div>10203040</div><div><b>C</b>.....<b>A</b>.....<b>G</b>.....<b>CA</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....</div><div>→←</div></div>	<7 bp>59,0
T23A	YP_003345672	<i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10	<div><div>10203040</div><div><b>C</b>.....<b>A</b>.....<b>G</b>.....<b>CA</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>A</b>.....</div><div>→←</div></div>	<7 bp>59,0
T21	YP_001244471	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1	<div><div>10203040</div><div><b>C</b>.....<b>CA</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>T</b>.....</div><div>→←</div></div>	<7 bp>59,0
T20B	NP_227863	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	<div><div>10203040</div><div><b>C</b>.....<b>CA</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>T</b>.....</div><div>→←</div></div>	<7 bp>59,0
T22	YP_001470925	<i>Thermotoga lettingae</i> TMO	<div><div>10203040</div><div><b>T</b>.....<b>TA</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>C</b>.....<b>T</b>.....GGG<b>AT</b>.....<b>G</b>.....<b>T</b>.....</div><div>→←</div></div>	<9 bp>54,5

\* El sombreado indica el posible codón de terminación de la transposasa.

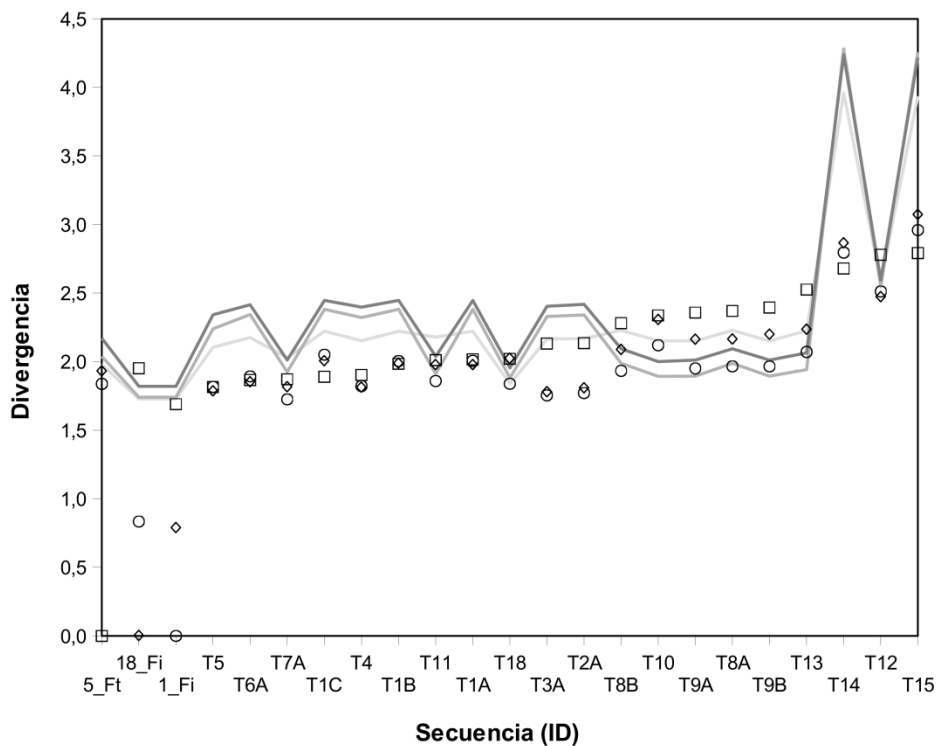
Similitud (%)



**Figura 4.37.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS605\_III de *Fervidobacterium* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos la transposasa de referencia (\*) de *F. thailandense*.



**Figura 4.38.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas IS605\_III de *Fervidobacterium* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.37). Línea azul, *F. thailandense*; línea púrpura, *F. islandicum*; línea discontinua amarilla, *Thermotoga*; líneas continuas en gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.

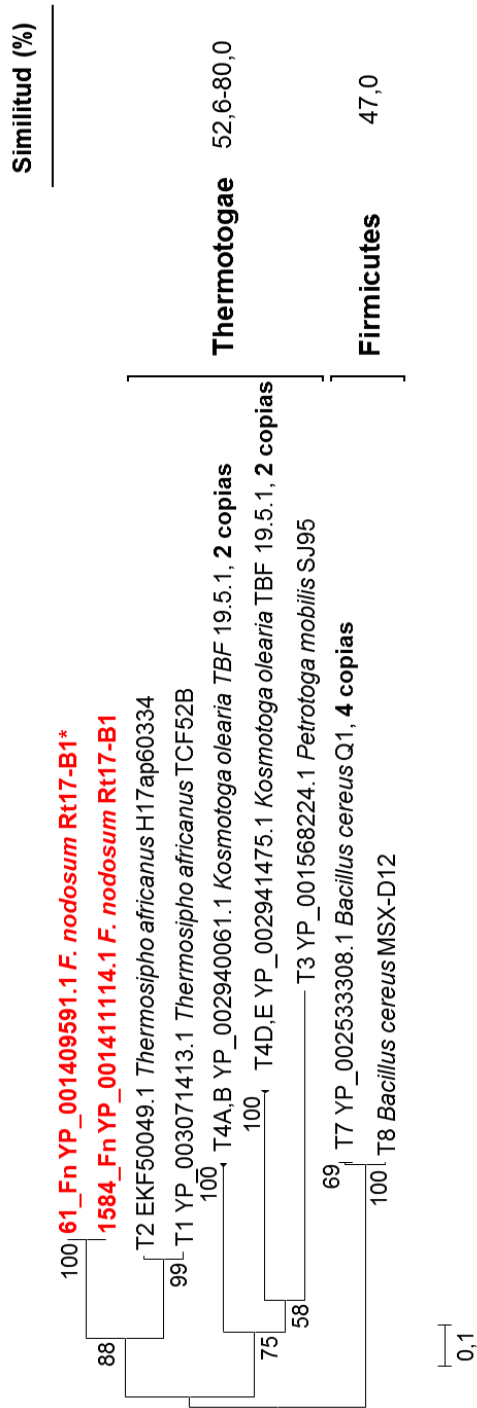


**Figura 4.39.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *Fervidobacterium* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS605\_III. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *Fervidobacterium* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 5\_Ft (cuadrados; línea gris claro), 18\_Fi (rombos; línea gris oscuro) y 1\_Fi (círculos; línea gris medio). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.37).

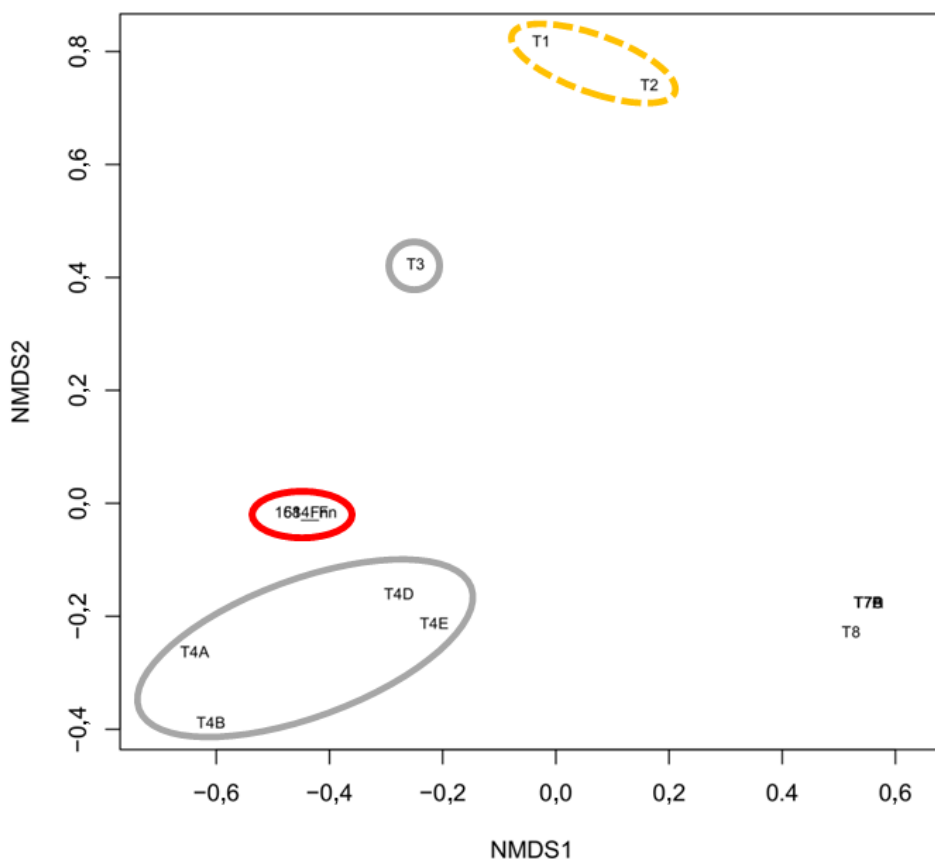
**Tabla 4.14.** Secuencias repetitivas situadas en el extremo derecho de la IS del grupo de transposasas IS605\_III detectado en *Fervidobacterium* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las secuencias palindrómicas del extremo derecho de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de la transposasa 5\_Ft de *F. thailandense* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas. (Página siguiente) ►

ID	Número de acceso	Organismo	Extremo derecho*	Identidad (%)
5_Ft	LWAF01000000	<i>Fervidobacterium thailandense</i> sp. FC2004	<div> <div> 102030405060 </div> <div> GAG-CTGGTAAGAA-TCC-CAT-CCCCTTCAGGGA-TTGGGACTGGGTCAA </div> </div>	91,4
T2A	NP_227863	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...CC...CC... </div> </div>	91,4
T3A	YP_001244471	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...CC...CC... </div> </div>	87,2
1_Ft	KHG30949	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...AC...T...C... </div> </div>	83,3
T7A	YP_001470925	<i>Thermotoga lettingiae</i> TMO	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...AC...T...T... </div> </div>	87,2
T5	EJX25986	<i>Thermotoga</i> sp. EMP	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...CACC...CACC...GA... </div> </div>	87,2
T4	YP_003346500	<i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...CACC...CACC...GA... </div> </div>	87,2
T6A	YP_001738194	<i>Thermotoga</i> sp. RQ2	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...CACC...A...G...GA... </div> </div>	82,9
T1C	YP_002534175	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TG...A...CC...TG...GAC... </div> </div>	78,0
T1A	YP_002535355	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TG...C...A...CC...TG...CCTAAAGGAATCCTAT...T...GAC... </div> </div>	55,2
T1B	YP_002533672	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TG...A...CC...TG...TT.C.T...C...GAC... </div> </div>	68,0
T8A	YP_004799630	<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i> 6A	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TC...T...G...T...T...C...AA... </div> </div>	77,0
T9A	YP_004025437	<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i> I77R1B	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TC...T...G...T...T...C...AA... </div> </div>	77,0
T13	YP_003841297	<i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i> OB47	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TC...G...T...GG...T...C...G...AA... </div> </div>	70,8
T10	YP_003991154	<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> 108	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TC...T...G...T...T...A...C...G...AA... </div> </div>	70,8
T11	YP_001181410	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...ACC...GAA...T...GC...T...TGGG...C...GA...A... </div> </div>	56,0
T9B	YP_004025349	<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i> I77R1B	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TC...T...G...T...T...T...T...C...G...AA... </div> </div>	64,5
T8B	YP_004798165	<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i> 6A	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...TC...T...G...T...T...T...A...C...G...AA... </div> </div>	64,5
T12	YP_003826831	<i>Acetohalobium arabaticum</i> DSM 5501	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...T...G...T...T...T...T...G...C...G...A... </div> </div>	51,8
T14	YP_444347	<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...AAGCCCGTGA.GAA...T...CC...G...T...AA... </div> </div>	40,7
T15	YP_003570116	<i>Salinibacter ruber</i> M8	<div> <div> 102030405060 </div> <div> ...AAGCCCGT.A.GAG...T...C...T...CC...G...AA... </div> </div>	46,2
555_Fp	YP_005470837	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	<div> <div> 102030405060 </div> <div> C...TA.C.CATGA.GAA...T...GC...A...T...C...G...A... </div> </div>	51,9

\* El sombreado indica el posible codón de terminación de la transposasa.

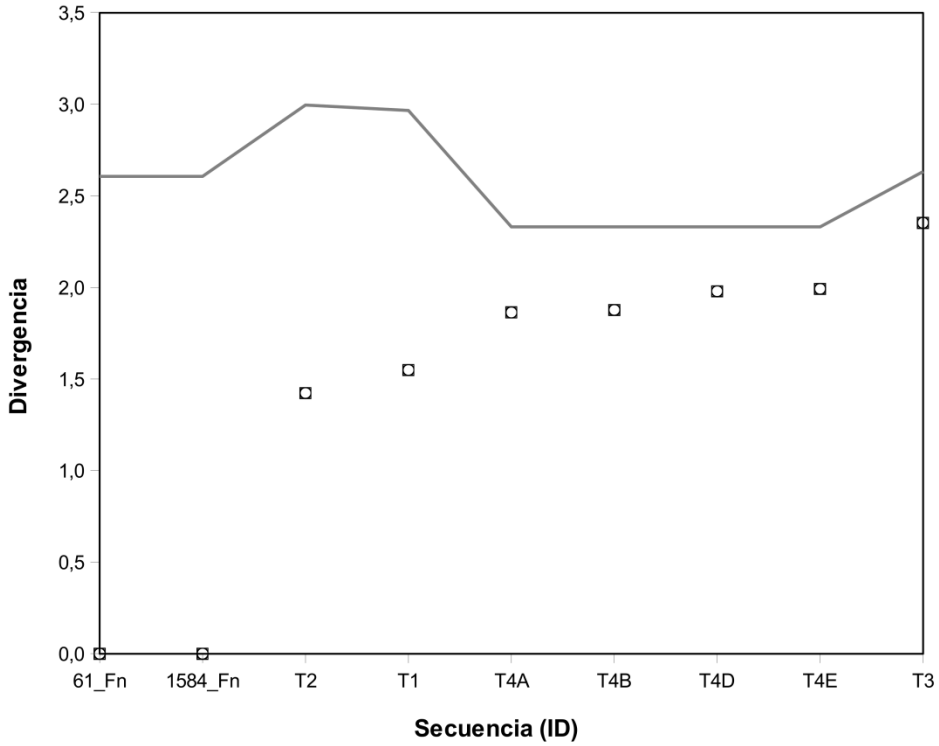


**Figura 4.40.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS3\_I de *F. nodosum* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. nodosum*.



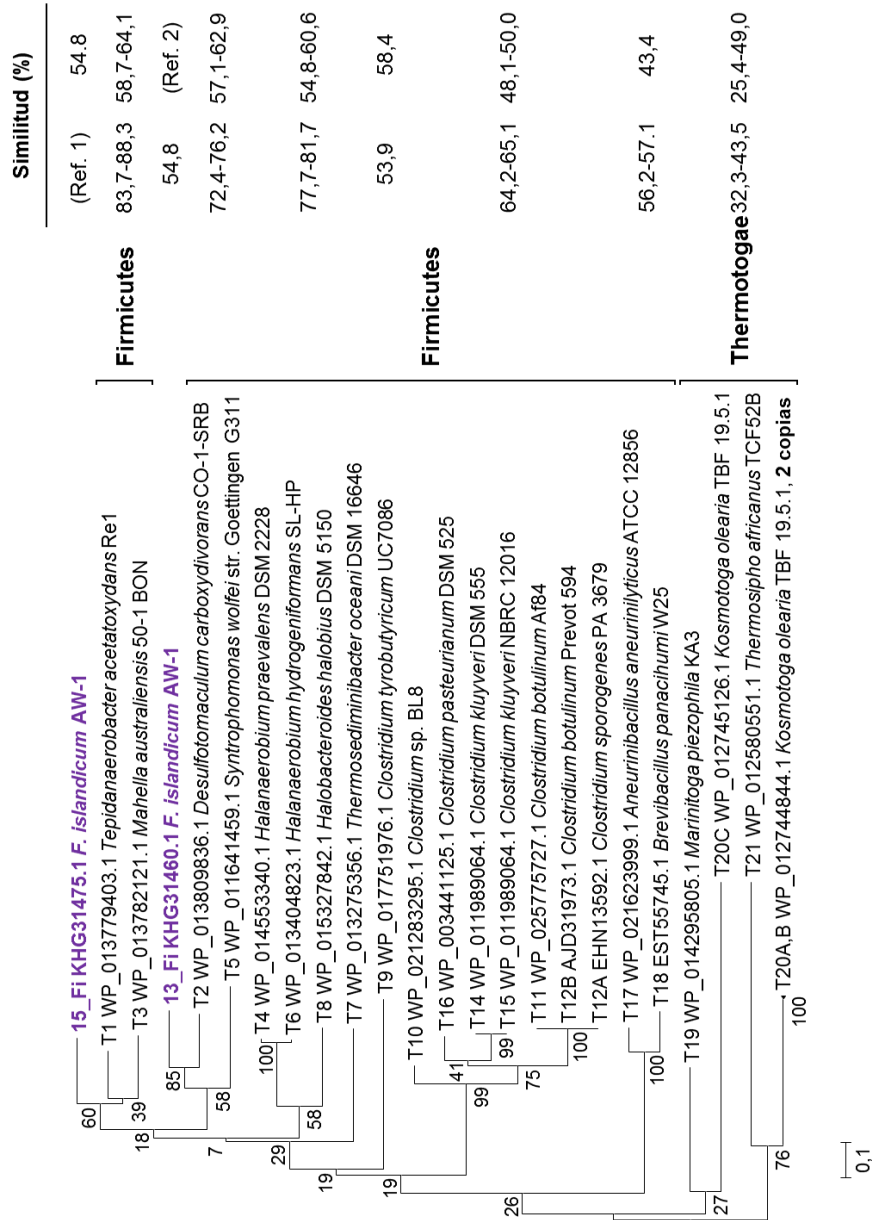
**Figura 4.41.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia del gen del grupo de transposasas IS3\_I de *F. nodosum* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.40). Línea continua roja, *F. nodosum*; línea discontinua amarilla, *Thermosiphonia*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.





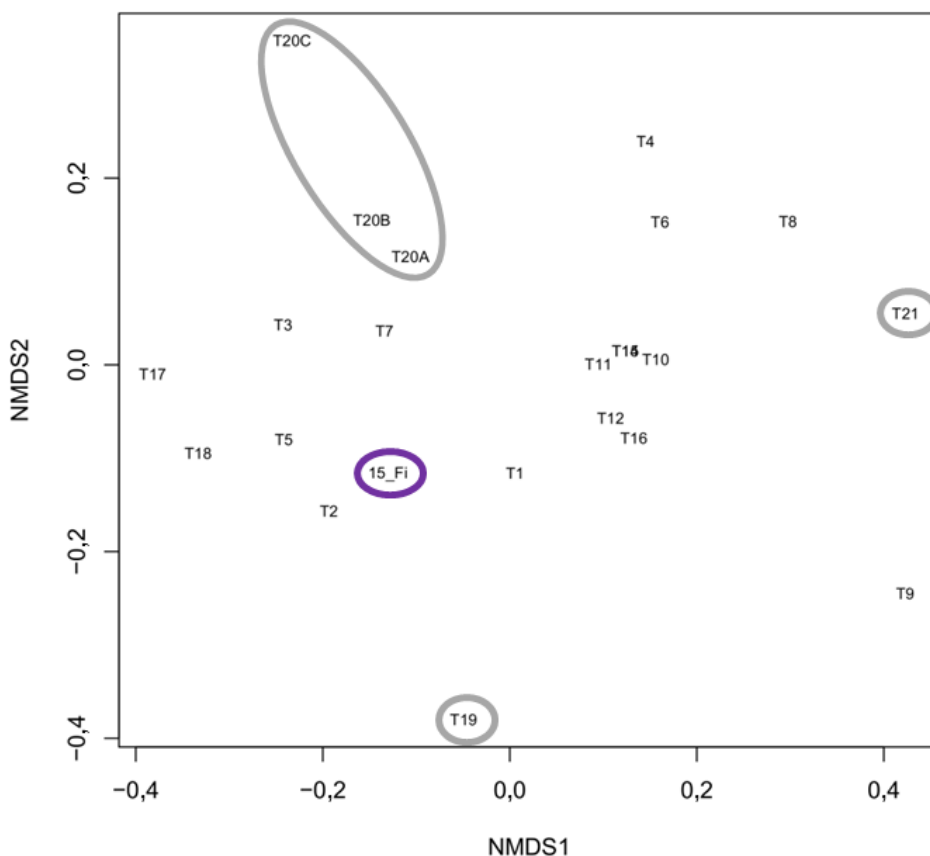
**Figura 4.42.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. nodosum* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS3\_I. Los cuadrados representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa 61\_Fn de *F. nodosum* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 61\_Fn (cuadrados) y 1584\_Fn (círculos). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.40).





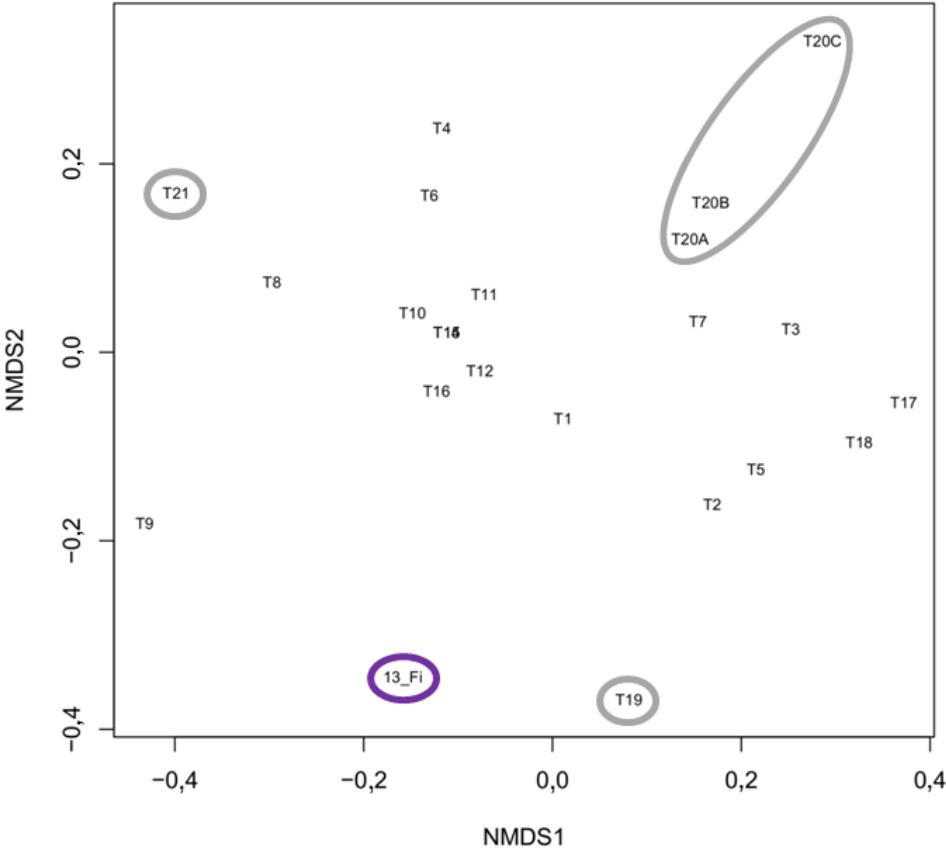
**Figura 4.43.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS3\_II de *F. islandicum* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En las columnas de la derecha se muestran los porcentajes de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de las transposasas de *F. islandicum* (15\_Fi, Ref. 1; 13\_Fi, Ref. 2)

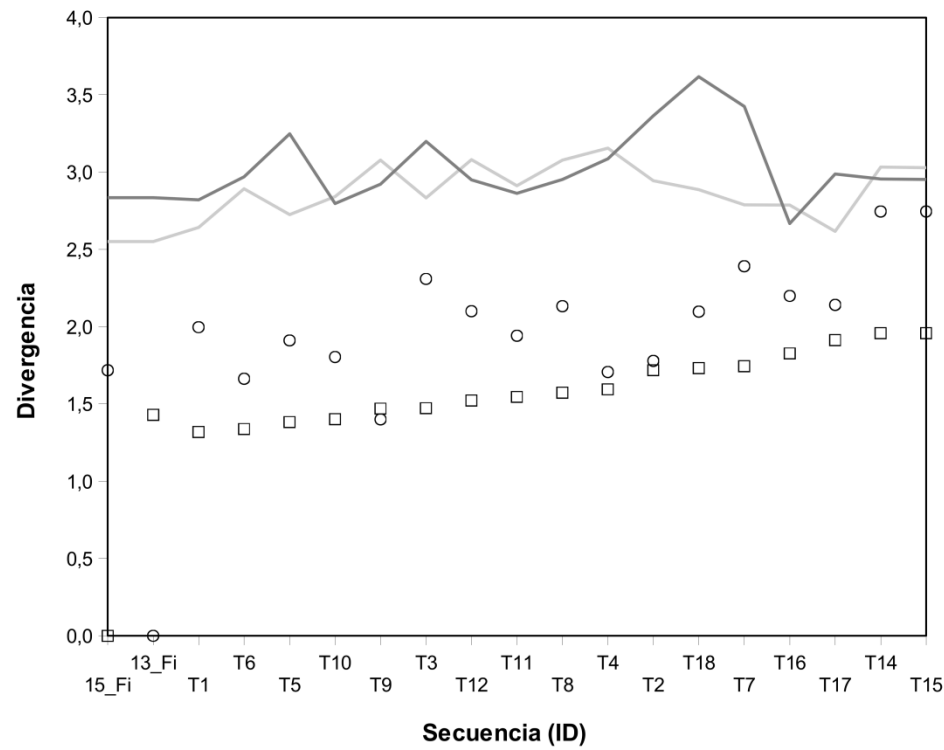
**A**



**Figura 4.44.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas IS3\_II de *F. islandicum* y secuencias relacionadas. Se presenta un análisis NMDS para las dos transposasas detectadas: 15\_Fi (**A**) y 13\_Fi (**B**). La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.43). Línea continua azul, *F. islandicum*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae. (Continúa en la página siguiente) ►

**B**





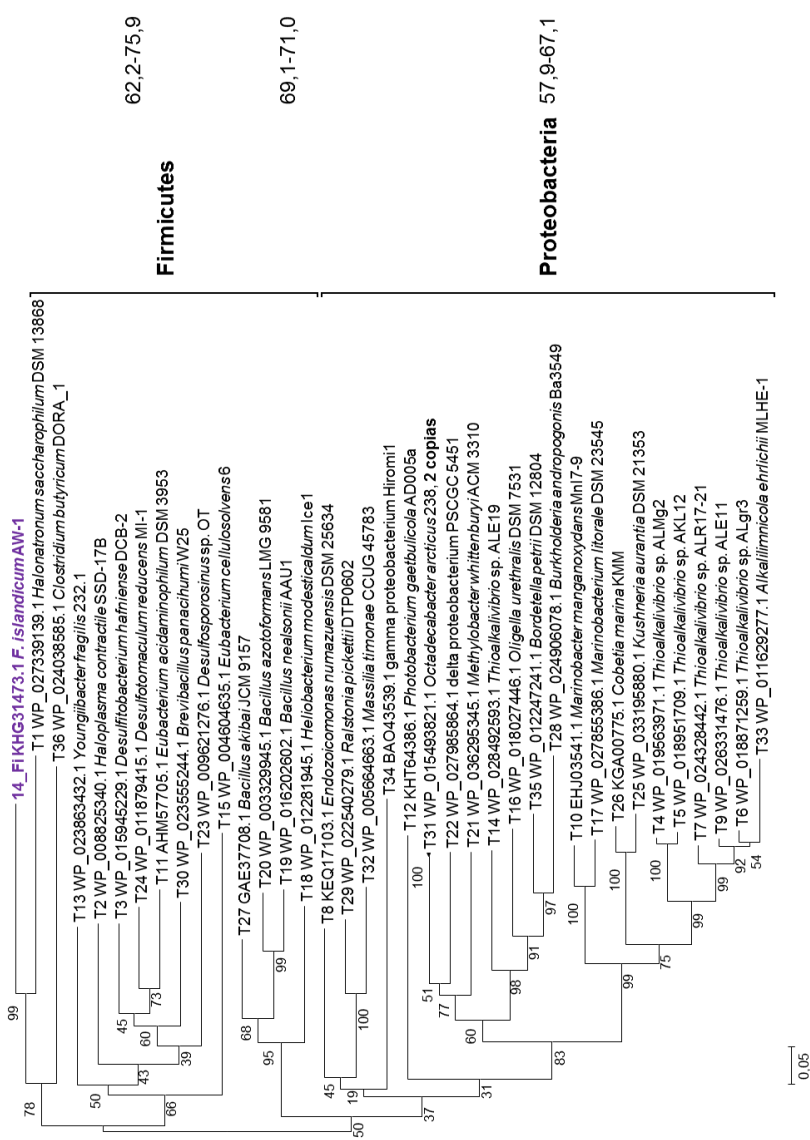
**Figura 4.45.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. islandicum* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS3\_II. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *F. islandicum* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 15\_Fi (cuadrados; línea gris claro) y 13\_Fi (círculos; línea gris oscuro). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.43).

**Tabla 4.16.** Secuencias repetitivas situadas a ambos extremos de la IS del grupo de transposasas IS3\_II detectadas en *F. islandicum* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las IRs del extremo izquierdo (A) y del extremo derecho (B) de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de la transposasa 15\_Fi de *F. islandicum* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas. (Página siguiente). ►

ID	Número de acceso	Organismo	IR izquierda	Identidad (%)	IR derecha	Identidad (%)
15_Fi	KHG31475	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	..... ..... ..... ATTAGCCCCCTAACGAGA	<60 bp>	..... ..... ..... TCTCCGGAATTAGGGGT	<0 bp>
13_Fi	KHG31460	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	..... ..... ..... CT.....T.....	<58 bp>	ND	-
T1	YP_004461791	<i>Topidanaerobacter acetatoydans</i> Re1	..... ..... ..... CAT.....C.AC	<50 bp>	..... ..... ..... G.A.GA	60,8
T2	YP_004496552	<i>Desulfotomaculum carboxydvorans</i> CO-1-SRB	..... ..... ..... T.....CC	<45 bp>	..... ..... ..... G.ATTATTA.T	34,7
T3	YP_004464520	<i>Mahella australiensis</i> 50-1 BON	..... ..... ..... CT.....	<62 bp>	..... ..... ..... A.....	90,9
T4	YP_005836472	<i>Halanaerobium praevalens</i> DSM 2228	..... ..... ..... AT.....	<53 bp>	..... ..... ..... AT.T	73,9
T5	YP_754738	<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> str. Goettingen G311	..... ..... ..... T.....C.T	<54 bp>	..... ..... ..... AT.C	69,5
T6	YP_003994071	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i>	..... ..... ..... AT.....	<53 bp>	..... ..... ..... T.AT.T	69,5
T7	YP_003824930	<i>Thermosediminibacter oceanii</i> DSM 16646	..... ..... ..... TT.....T	<50 bp>	..... ..... ..... AA.....	86,3
T8	YP_007316221	<i>Halobacteroides halobius</i> DSM 5150	..... ..... ..... AT.....T	<64 bp>	..... ..... ..... AT	81,8
T9	WP_017751976	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UC7086	..... ..... ..... AT.....T	<52 bp>	ND	-
T10	EQB88235	<i>Clostridium</i> sp. BL8	ND	<31 bp>	..... ..... ..... G.AA.CG.A	65,2
T11	WP_025775727	<i>Clostridium botulinum</i> Af84	..... ..... ..... C.G.....GA.T	<55 bp>	..... ..... ..... G.A.....A.A	77,2
T12	EHN13592	<i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	..... ..... ..... C.....GC.T	<54 bp>	..... ..... ..... G.AA.A.A	69,5
T14	YP_001393897	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	..... ..... ..... C.....AT.G	<55 bp>	..... ..... ..... G.AA.CG	69,5
T15	YP_002470898	<i>Clostridium kluyveri</i> NBRC 12016	..... ..... ..... C.....AT.G	<55 bp>	..... ..... ..... G.AA.CG	69,5
T16	KER14303	<i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525 = ATCC 6013	..... ..... ..... C.....GA.T	<55 bp>	..... ..... ..... G.AA.CG.A	69,5
T17	ERI10929	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> ATCC 12856	..... ..... ..... C.A.....AA.TTG	<61 bp>	ND	-
T18	EST55745	<i>Brevibacillus panacihumii</i> W25	..... ..... ..... C.....AA.TTG	<60 bp>	ND	-
T20A	YP_002940061	<i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1	..... ..... ..... A.C.....A.A	<50 bp>	..... ..... ..... G.TCATT.T	54,5
T20B	YP_002940038	<i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1	..... ..... ..... A.C.....A.A	<50 bp>	..... ..... ..... G.TCATT.T	47,8
T20C	YP_002940348	<i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1	..... ..... ..... C.GCT.....G.A.AT	<50 bp>	..... ..... ..... G.A.TT.TC	60,8
T21	YP_003071413	<i>Thermosipho africanus</i> TCF52B	..... ..... ..... CG.....T.A.....C.TA.A	<61 bp>	..... ..... ..... AAT.....T	72,7

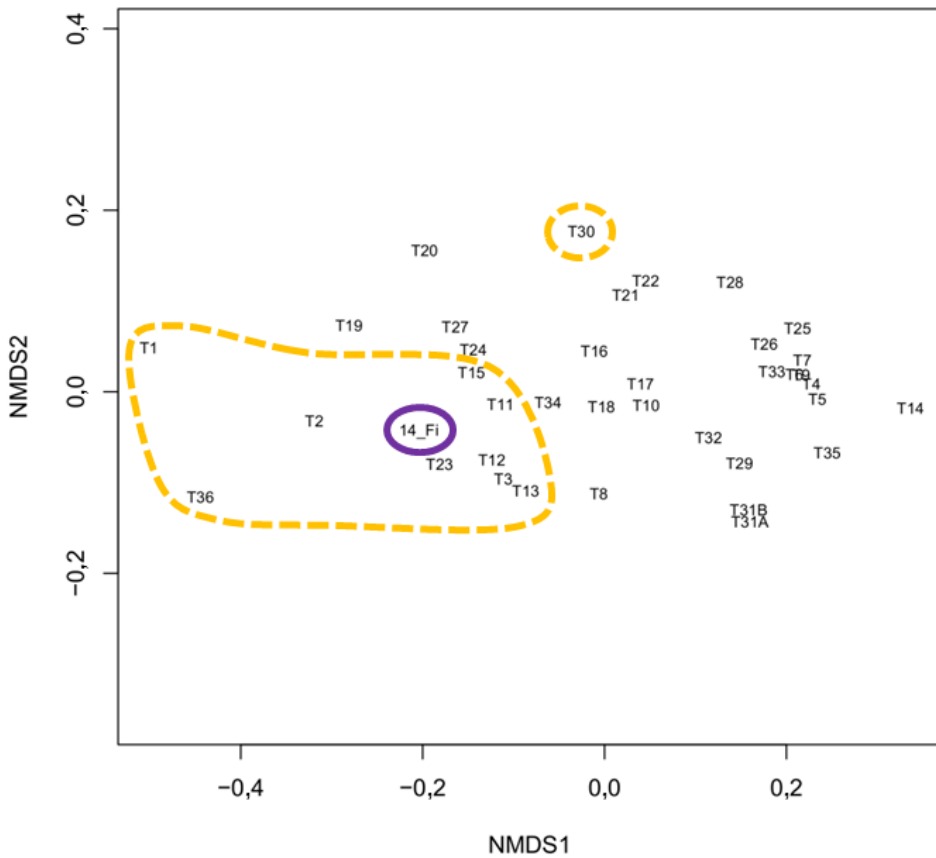
\* No detectada, ND.

Similitud (%)

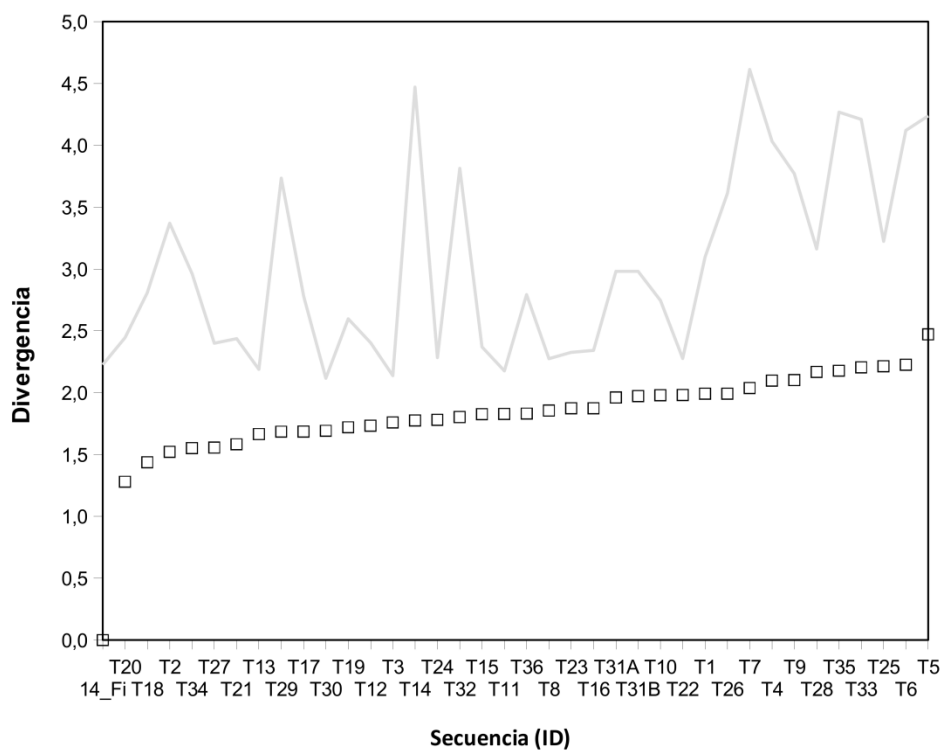


**Figura 4.46.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas IS3\_III de *F. islandicum* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de *F. islandicum*.





**Figura 4.47.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia del gen del grupo de transposasas IS3\_III de *F. islandicum* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.46). Línea púrpura, *F. islandicum*; línea discontinua amarilla, división Firmicutes.



**Figura 4.48.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. islandicum* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas IS3\_III. Los cuadrados representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; la línea indica las estimaciones de divergencia de la transposasa de *F. islandicum* en relación al genoma completo de cada especie. La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.46).

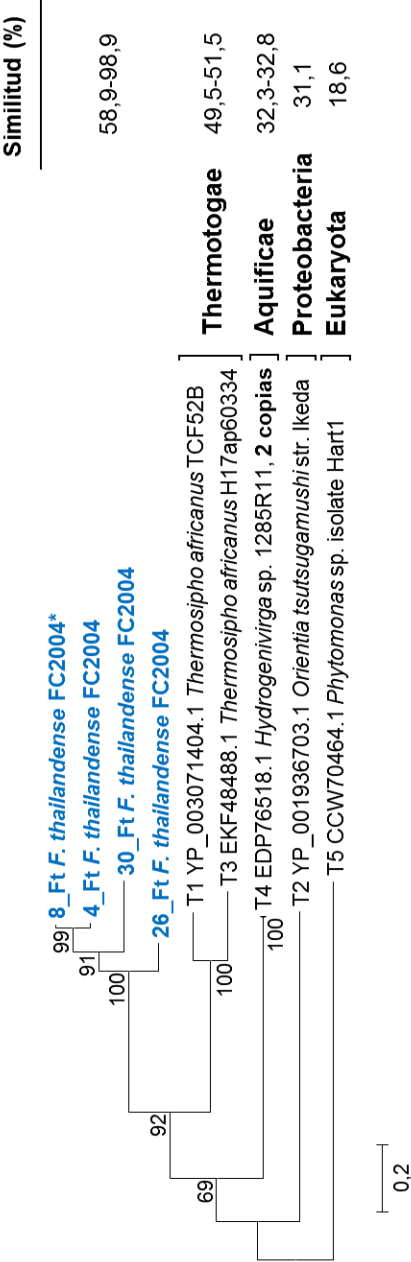
**Tabla 4.17.** Secuencias repetitivas situadas a ambos extremos de la IS del grupo de transposasas IS3\_III detectado en *F. islandicum* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las IRs del extremo y derecho de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de *F. islandicum* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas.

[illegible]

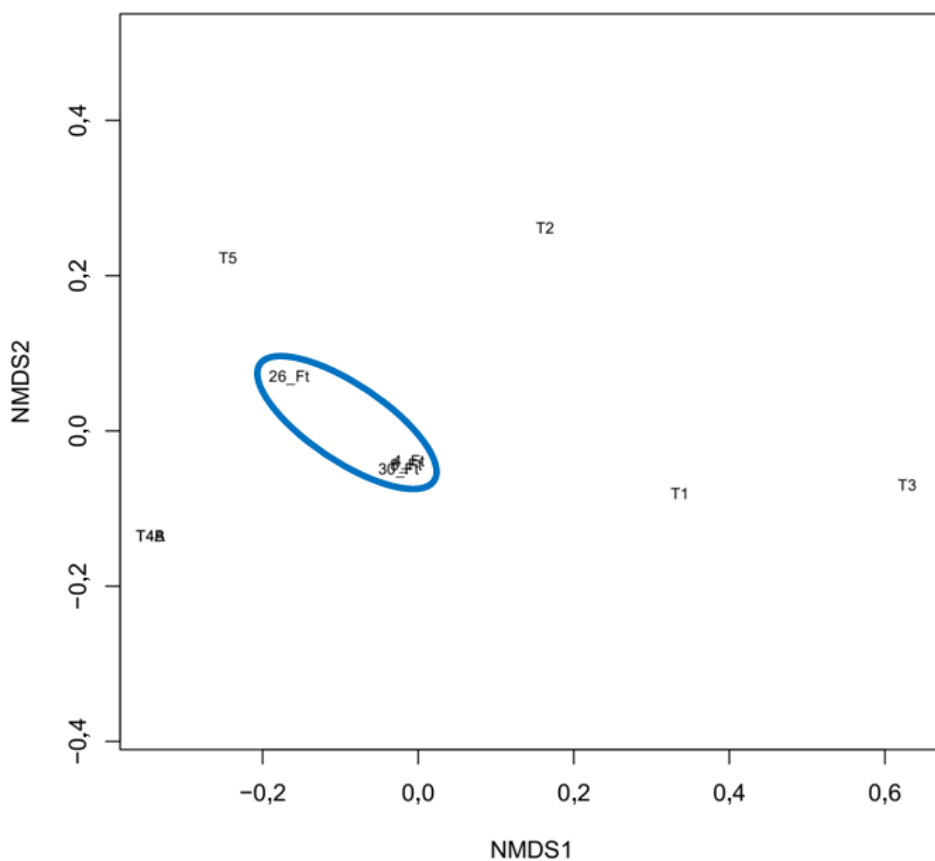
(Continuación de Tabla 4.17)

T17	WP_027855386	<i>Marinobacterium litorale</i> DSM 23545	.....C..C..-.....	<21 bp>	85,7	ND*	.....-.....CG.....G..T	80,0
T18	YP_001679425	<i>Hellobacterium modesticaldum</i> Ice1	CC.G.....-..C.....	<48 bp>	80,0	<200 bp>	.T.....-.....	95,0
T19	EOR23991	<i>Bacillus nealsonii</i> AAU1	CC.C.....-.....G.....	<46 bp>	80,0		ND	-
T20	EKN8828	<i>Bacillus azotoformans</i> LMG 9581	CC.C.....-.....A.....	<45 bp>	80,0		ND	-
T21	WP_036295345	<i>Methylobacter whittierburyi</i> ACM 3310	CC.G.....-.....	<55 bp>	80,0		ND	-
T22	WP_027985864	<i>delta proteobacterium</i> PSCGC 5451	CC.G.....-.....	<41 bp>	85,0	<39 bp>	.....-.....C.....	95,0
T23	EGW38157	<i>Desulfosporosinus</i> sp. OT	CC.G.....-.....C.....	<52 bp>	71,4		ND	-
T24	YP_001114452	<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	CC.G.....-.....	<50 bp>	85,0		ND	-
T25	WP_033195880	<i>Kushneria aurantia</i> DSM 21353	.....GC..C..C..-.....	<24 bp>	76,1	<21 bp>	.C.....-.....G.....GG.T	75,0
T26	KGA00775	<i>Cobetia marina</i>	.....C..CC.C..-.....	<24 bp>	76,1	<21 bp>	.C.....-.....G.....G..TT	75,0
T27	GAE37708	<i>Bacillus akibai</i> JCM 9157	CC.C.....-.....A.....	<49 bp>	80,0	<124 bp>	.....-.....A.....	95,0
T28	WP_024906078	<i>Burkholderia andropogonis</i> Ba3549	CC.CG..C..A..C.....GA	<51 bp>	52,3		ND	-
T29	YP_008601019	<i>Ralstonia pickettii</i> DTP0602	CCGGC..C..A.....	<93 bp>	61,9	<371 bp>	.....G.....GC..GTC.G..	61,9
T30	EST55348	<i>Brevibacillus panachiumi</i> W25	CC.G.....C..A.....	<49 bp>	71,4	<23 bp>	.....-.....	100,0
T31	YP_007698042	<i>Octadecabacter arcticus</i> 238	AG.G.....C..G..-.....	<47 bp>	71,4		ND	-
T32	EKU82280	<i>Massilia timonae</i> CCUG 45783	CCGG.....C..A.....	<92 bp>	66,6	<8 bp>	.....-.....CG.....	90,0
T31B	YP_007701886	<i>Octadecabacter arcticus</i> 238	AG.G.....C..G..-.....	<47 bp>	66,6		ND	-
T33	YP_742373	<i>Alkalimnicola ehrlichii</i> MLHE-1	.....CA..C..AC.....	<25 bp>	71,4	ND	.....C.....GG..CA.GTG..	60,0
T34	BAO43539	<i>gamma proteobacterium</i> Hiromi1	CTG.....C..C.....	<51 bp>	66,6	<8 bp>	.....-.....T..G.....	90,0
T35	YP_001628818	<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	CCGC.....C..A.....GA	<49 bp>	57,1	<7 bp>	TC.....GC.....G..G	70,0
T36	ETI92104	<i>Clostridium butyricum</i> DORA_1	ND		-	<90 bp>	.....A.....C.....CT..	76,1

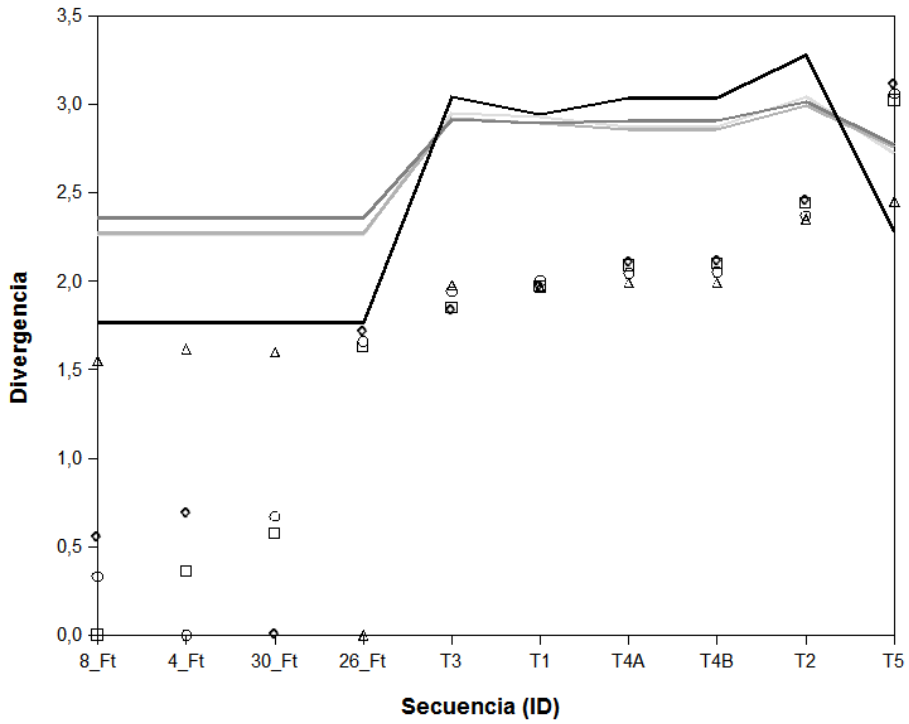
\* No detectada, ND.



**Figura 4.49.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos de la familia de transposasas IS4 de *F. thailandense* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. thailandense*.



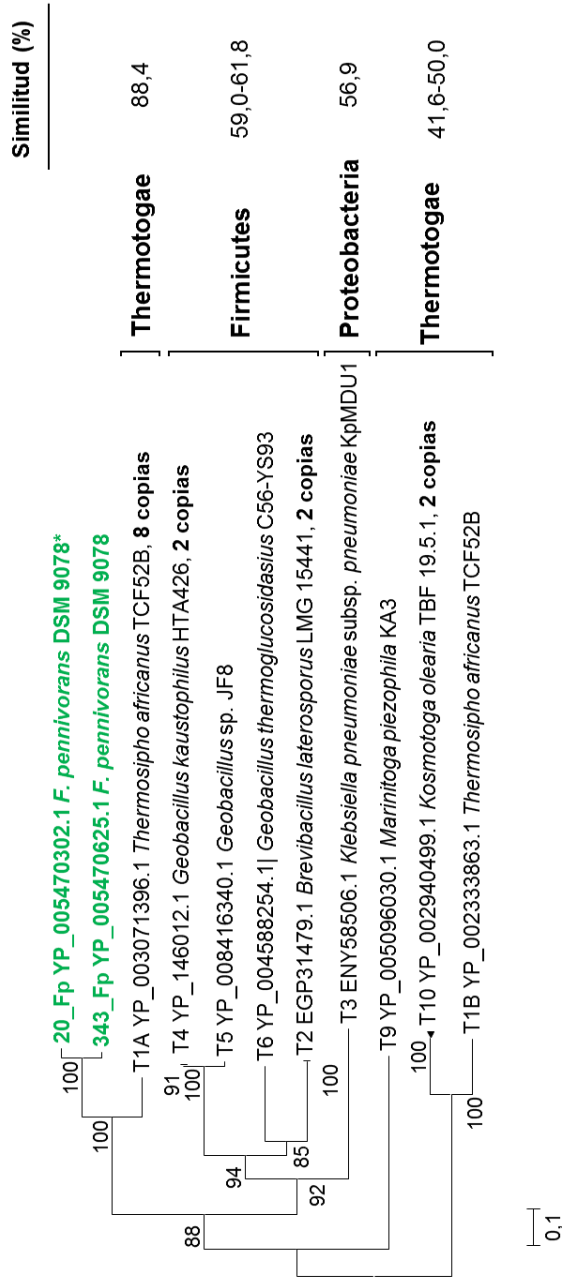
**Figura 4.50.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes de la familia de transposasas IS4 de *F. thailandense* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.49). Línea continua azul, *F. thailandense*.



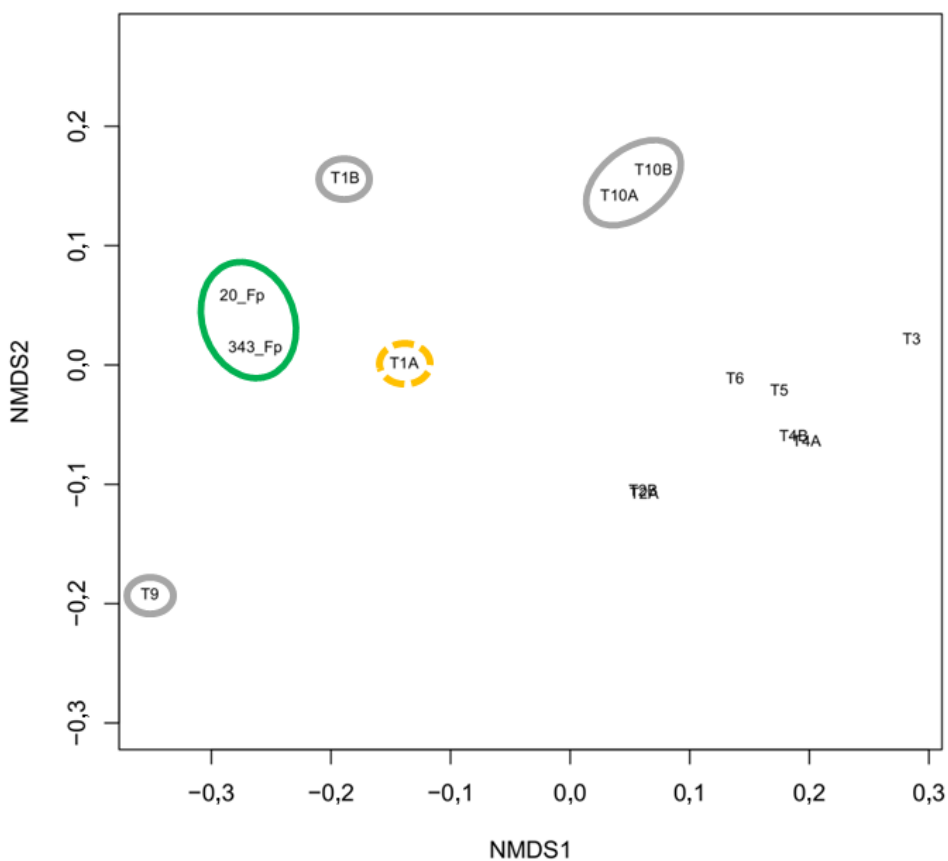
**Figura 4.51.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. thailandense* y genes relacionados dentro de la familia de transposasas IS4. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *F. thailandense* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 8\_Ft (cuadrados; línea gris claro), 4\_Ft (círculos; línea gris medio), 30\_Ft (rombos; línea gris oscuro) y 26\_Ft (triángulos; línea negra). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.49).



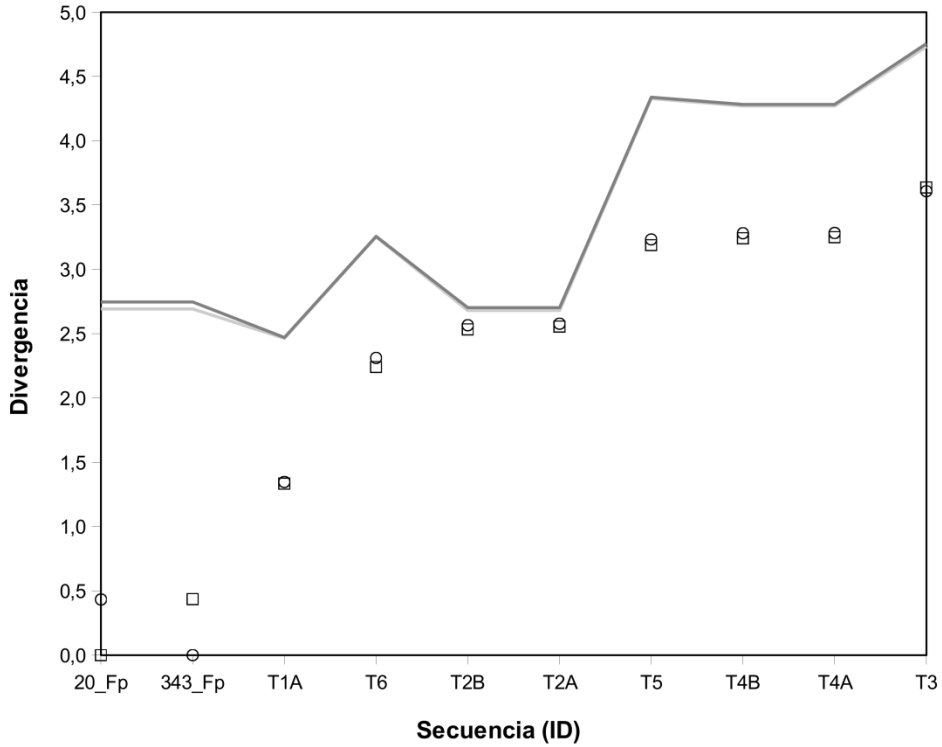




**Figura 4.52.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas tipo A de *F. pennivorans* y las secuencias más relacionadas, así como las secuencias más cercanas dentro de la división Thermotogae. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. pennivorans*.



**Figura 4.53.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas tipo A de *F. pennivorans* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.52). Línea continua verde, *F. pennivorans*; línea discontinua amarilla, *Thermosipho*; línea continua gris, otras secuencias cercanas de la división Thermotogae.

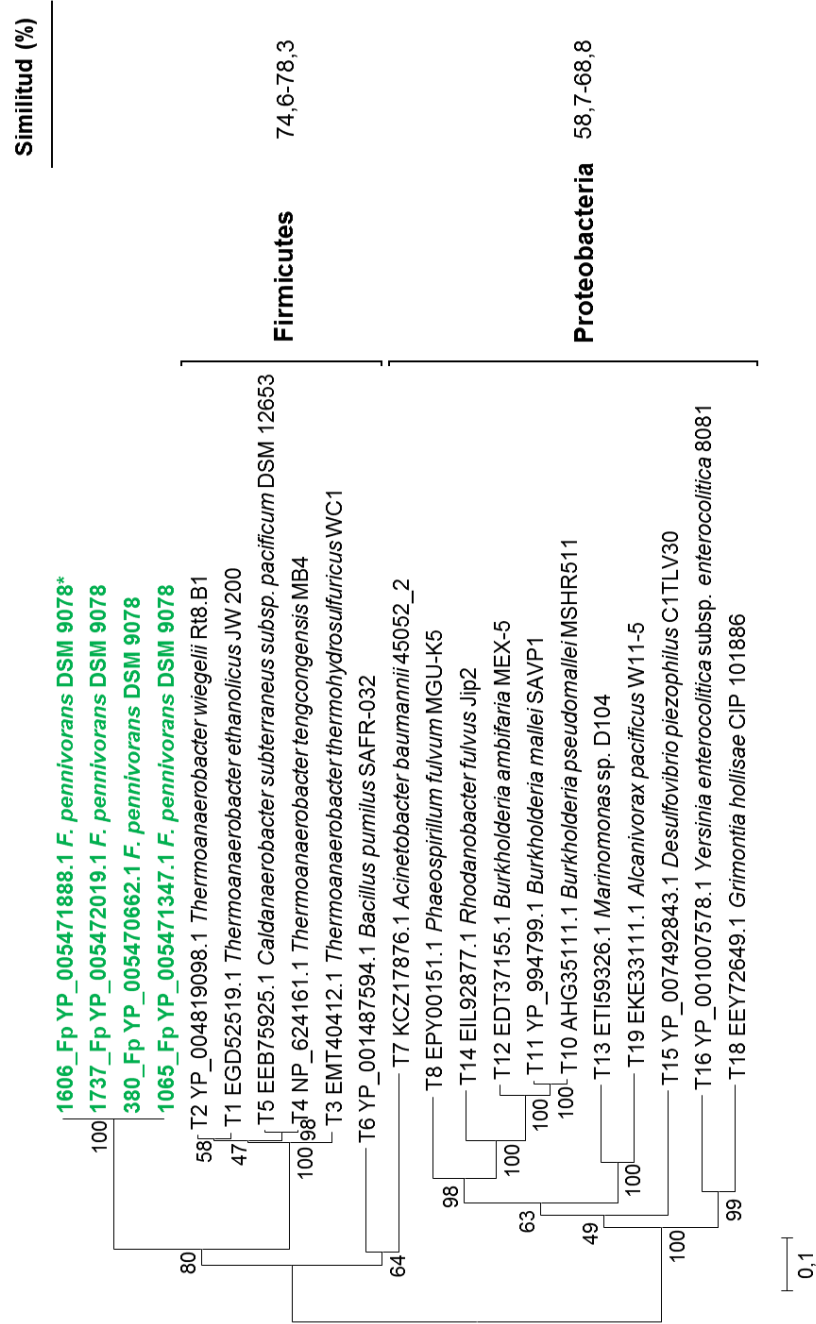


**Figura 4.54.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. pennivorans* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas tipo A. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *F. pennivorans* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 20\_Fp (cuadrados; línea gris claro) y 343\_Fp (círculos; línea gris oscuro). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.52).

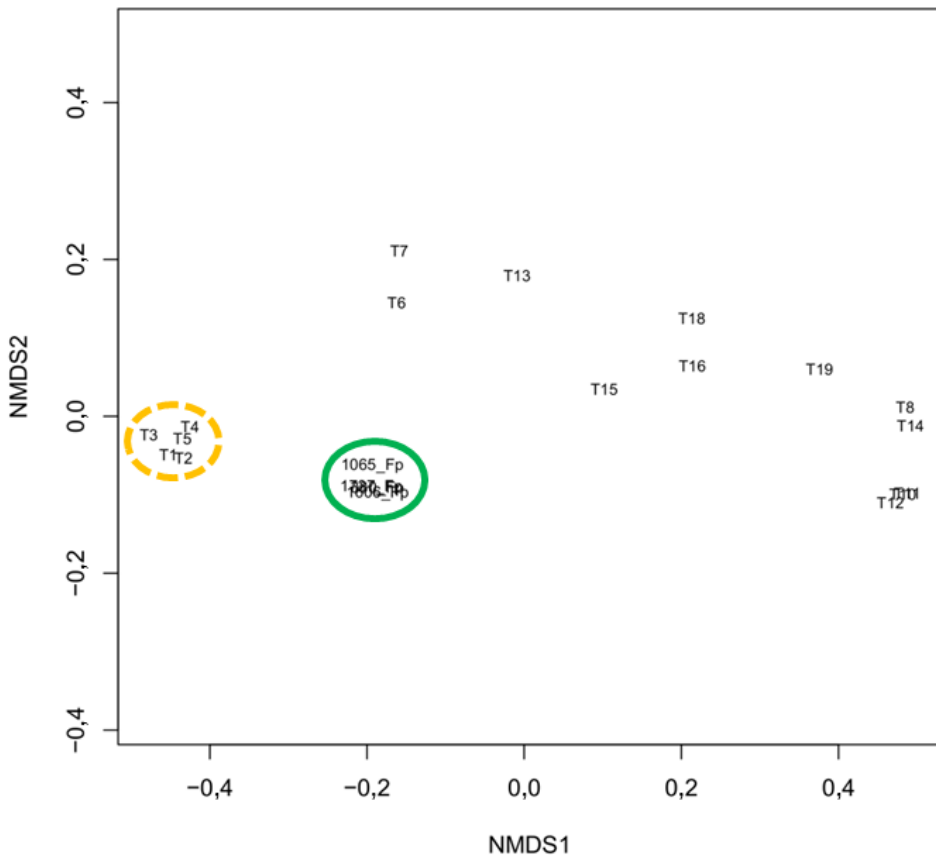


**B**

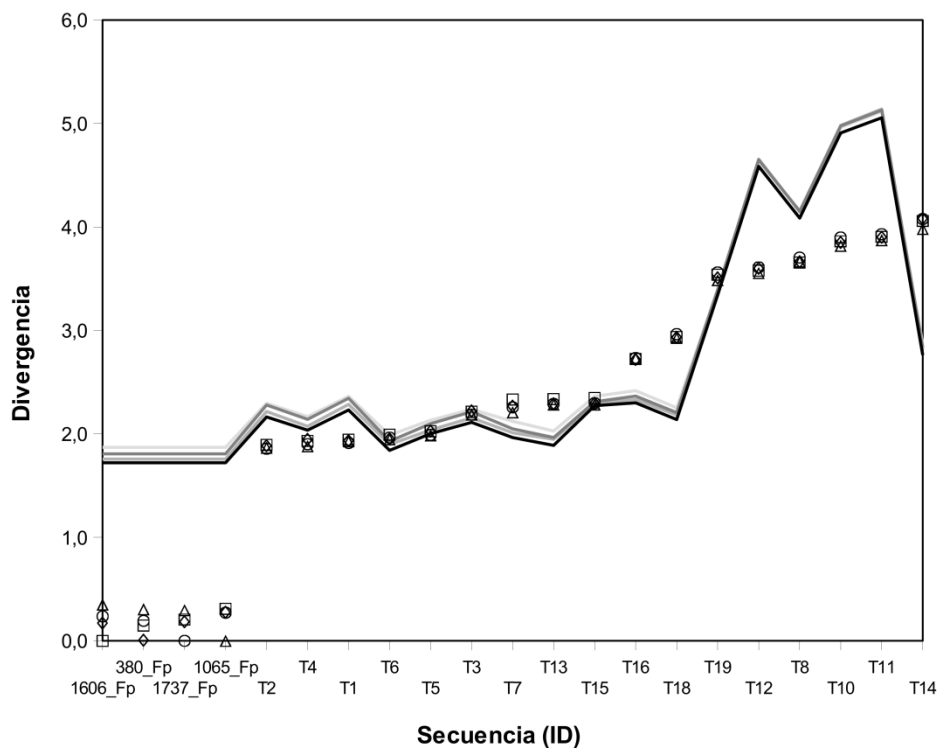
ID	Número de acceso	Organismo	IR derecha				Identidad (%)
			10	20	30	40	
20_Fp	YP_005470302	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp> ---TACTTTTTTATCTGTCCCACTTTCGGGGTAAGTCCA				
343_Fp	YP_005470625	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp> ---T				97,3
T1A	YP_003071396	<i>Thermosiphon africanus</i> TCF52B	< - bp> ---T---C---TT				81,5
T2A	EGP34699	<i>Brevibacillus laterosporus</i> LMG 15441	< - bp> ATGGGG---G---AAGT---T---GA---A---AT				56,5
T2B	EGP31479	<i>Brevibacillus laterosporus</i> LMG 15441	< - bp> ATGGGG---G---AAGT---T---GA---A---AT				56,5
T5	YP_008416340	<i>Geobacillus</i> sp. JF8	< - bp> TGGGTA---CACA---T---GA---A---A---T---T				55,8
T4B	YP_147737	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	< - bp> TGGGTA---CACA---T---GA---A---A---T---T				55,8
T4B	YP_146012	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	< - bp> TGGGTA---CACA---T---GA---A---A---T---T				55,8
T1B	YP_002333863	<i>Thermosiphon africanus</i> TCF52B	< - bp> ---A---TT			TGC---T---A	46,1
T10A	YP_002940499	<i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1	< - bp> ---G---TT			AGC---T---A	46,1
T10B	YP_002940349	<i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1	< - bp> ---G---TT			AGC---T---A	46,1



**Figura 4.55.** Relación filogenética entre las secuencias de aminoácidos del grupo de transposasas tipo B de *F. pennivorans* y las secuencias más relacionadas. En la columna de la derecha se muestra el porcentaje de similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de la transposasa de referencia (\*) de *F. pennivorans*.



**Figura 4.56.** Análisis multivariable (NMDS) de las frecuencias de tetranucleótidos para la secuencia de los genes del grupo de transposasas tipo B de *F. pennivorans* y secuencias relacionadas. La identificación de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.55). Línea continua verde, *F. pennivorans*; línea discontinua amarilla, Firmicutes.



**Figura 4.57.** Medidas cuantitativas de divergencia K-L entre *F. pennivorans* y genes relacionados dentro del grupo de transposasas tipo B. Los símbolos representan estimaciones de divergencia por pares entre genes que codifican transposasas; las líneas indican las estimaciones de divergencia de las transposasas de *F. pennivorans* en relación al genoma completo de cada especie. Las divergencias se calcularon con respecto a 1606\_Fp (cuadrados; línea gris claro), 380\_Fp (rombos; línea gris oscuro), 1737\_Fp (círculos; línea gris medio) y 1065\_Fp (triángulos; línea negra). La identificación (ID) de las transposasas utiliza la misma nomenclatura que en el análisis filogenético (Figura 4.55).



**Tabla 4.20.** Secuencias repetitivas situadas a ambos extremos de la IS del grupo de transposasas tipo B detectadas en *F. pennivorans* y las secuencias relacionadas. En la tabla están representadas las IRs del extremo izquierdo (A) y del extremo derecho (B) de la IS, su porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de *F. pennivorans* y la distancia al codón de inicio y terminación de la transposasa. Los números de identificación (ID) se corresponden con los utilizados en las figuras de este grupo de transposasas.

A		B	
ID	Número de acceso	Organismo	Identidad (%)
1606_Fp	YP_005471888	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	100,0
1737_Fp	YP_005472019	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	100,0
380_Fp	YP_005470662	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	100,0
1065_Fp	YP_005471347	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	100,0
T1	WP_003869481	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW 200	78,1
T2	YP_004819098	<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i> Rt8.B1	67,6
T3	EMT40412	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> WC1	78,1
T4	NP_624161	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	78,1
T5	WP_009610429	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>pacificus</i> DSM 12653	78,1
T16	YP_001007578	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081	56,2
T18	EEY72649	<i>Grimontia hollisae</i> CIP 101886	56,2
T15	YP_007492843	<i>Desulfovibrio piezophilus</i> C1TLV30	59,3
T13	ETI59326	<i>Marinomonas</i> sp. D104	50,0
T8	EPY00151	<i>Phaeospirillum fulvum</i> MGU-K5	53,1
T14	EIL92877	<i>Rhodanobacter fulvus</i> Jlp2	56,2
T12	EDT37155	<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5	53,1
T10	AHG35111	<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR511	50,0

**A**

ID	Número de acceso	Organismo	IR derecha			Identidad (%)
			10	20	30	
1606_Fp	YP_005471888	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp> <b>AA</b> <b>AAC</b> <b>TGGGGG</b> ----- <b>TTT</b> <b>GTCAA</b> <b>C</b> <b>AATCTGA</b> .....			
1737_Fp	YP_005472019	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp> ..... <b>TTT</b> <b>GTCAA</b> <b>C</b> <b>AATCTGA</b> .....		100,0	
380_Fp	YP_005470662	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp> ..... <b>TTT</b> <b>GTCAA</b> <b>C</b> <b>AATCTGA</b> .....		100,0	
1065_Fp	YP_005471347	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078	< - bp> ..... <b>TTT</b> <b>GTCAA</b> <b>C</b> <b>AATCTGA</b> .....		100,0	
T1	WP_003869481	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> JW 200	< - bp> ..... <b>TTT</b> <b>AC</b> ----- <b>A</b> ... <b>G</b>		70,3	
T2	YP_004819098	<i>Thermoanaerobacter wiegellii</i> Rt8.B1	< - bp> <b>T</b> ----- <b>TTC</b> <b>T</b> ----- <b>A</b> ...		74,0	
T3	EMT40412	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> WC1	< - bp> ..... <b>TTT</b> <b>C</b> ----- <b>A</b> ...		77,7	
T4	NP_624161	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	< - bp> ..... <b>TTT</b> <b>C</b> ----- <b>A</b> ... <b>C</b>		74,0	
T5	WP_009610429	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>pacificus</i> DSM 12653	< - bp> ..... <b>TTT</b> <b>C</b> ----- <b>A</b> ...		77,7	
T16	YP_001007578	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081	<17 bp> <b>A</b> ..... <b>C</b> ... <b>G</b> ... <b>G</b> ...		82,1	
T18	EEY72649	<i>Grimontia hollisae</i> CIP 101886	<66 bp> <b>A</b> ... <b>C</b> ..... <b>A</b> ... <b>G</b> ... <b>G</b> ...		82,1	
T15	YP_007492843	<i>Desulfovibrio piezophilus</i> C1TLV30	<36 bp> <b>A</b> ..... <b>G</b> ... <b>G</b> ... <b>G</b> ...		85,7	
T13	ETI59326	<i>Marinomonas</i> sp. D104	<147 bp> <b>A</b> <b>T</b> <b>C</b> ..... <b>A</b> ... <b>G</b> ... <b>GC</b> ...		71,4	
T8	EPY00151	<i>Phaeospirillum fulvum</i> MGU-K5	<29 bp> <b>CG</b> <b>C</b> ----- <b>T</b> ... <b>GG</b> ...		71,4	
T14	EIL92877	<i>Rhodanobacter fulvus</i> Jip2	<46 bp> <b>A</b> <b>C</b> ..... <b>C</b> ... <b>G</b> ... <b>G</b> ...		78,5	
T12	EDT37155	<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5	<35 bp> <b>A</b> <b>C</b> ..... <b>C</b> ... <b>G</b> ... <b>GC</b> ...		75,0	
T10	AHG35111	<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR511	<29 bp> <b>A</b> <b>C</b> ..... <b>C</b> ... <b>G</b> ... <b>G</b> ...		78,5	

\* El sombreado indica el posible codón de terminación de la transposasa.

## *Capítulo 5*

# **Viscosidad celular en procariotas y termoestabilidad de biomoléculas de bajo peso molecular**

## 5.1. Resumen

Algunas biomoléculas de bajo peso molecular, como por ejemplo el NAD(P)H, son inestables a altas temperaturas. Las consecuencias de este hecho sobre los microorganismos termófilos son desconocidas. Este estudio presenta un análisis de la estabilidad del NADH a diferentes temperaturas y viscosidades. La tasa de degradación de NADH incrementaba al aumentar la temperatura, mientras que al aumentar la viscosidad, la estabilidad del NADH aumentaba. En contra de lo establecido a partir de estudios en soluciones acuosas diluidas, el mantenimiento de viscosidades celulares relativamente elevadas podría resultar en una mayor estabilidad de biomoléculas de bajo peso molecular (por ejemplo, NADH) a altas temperaturas. El uso de un rotor molecular fluorescente permitió evaluar la viscosidad celular en diversos procariotas abarcando el rango de crecimiento de 10 a 100°C. Algunos mesófilos mostraron la capacidad de cambiar su viscosidad celular dependiendo de la temperatura de crecimiento. Los termófilos y termófilos extremos presentaban una viscosidad celular relativamente elevada, sugiriendo que este mecanismo puede ser una estrategia para prosperar a altas temperaturas. Los resultados corroboran la capacidad de termófilos y termófilos extremos (temperatura de crecimiento 50-80°C) para estabilizar y utilizar biomoléculas de bajo peso molecular que generalmente son consideradas inestables y de uso universal. Según nuestro conocimiento, este estudio presenta las primeras medidas de viscosidad celular en procariotas y demuestra que la viscosidad celular depende de la especie y la temperatura de crecimiento.

## 5.2. Introducción

El límite superior de temperatura a la que los microorganismos pueden crecer ha sido ampliamente discutido (Cowan, 2004; Stetter, 1999). Actualmente, es conocida la existencia de proliferación celular a 122°C; como es el caso de *Methanopyrus kandleri* cepa 116, aislado de fuentes hidrotermales de profundidades abisales marinas (Takai et al., 2008). Estos microorganismos utilizan básicamente las mismas biomoléculas y su maquinaria metabólica es similar a la de todos los demás seres vivos (Cowan, 2004; Stetter, 1999). Sin embargo, algunas de las biomoléculas necesarias para el funcionamiento celular y el crecimiento (por ejemplo, dinucleótidos de nicotinamida, adenosín trifosfato y fosforribosil fosfato, entre otras) son inestables a altas temperaturas (Daniel y Cowan, 2000). Por lo tanto, cabría esperar la existencia de mecanismos que proporcionen estabilidad a determinadas biomoléculas esenciales de modo que la vida pueda ser posible en ambientes de alta temperatura (Stetter, 1999; White, 1984).

Existen numerosos estudios que han intentado explicar la estabilidad a altas temperaturas de macrobiomoléculas esenciales, tales como ADN y proteínas (Grogan, 1998; Vieille y Zeikus, 2001). La estabilidad de ciertas proteínas en condiciones de alta temperatura se consigue por mecanismos intrínsecos (modificaciones en su secuencia y estructura) y por mecanismos extrínsecos (interacciones que dependen de la composición de la solución) (Vieille y Zeikus, 2001; Lee et al., 2002). Investigaciones sobre la termoestabilidad de proteínas a altas temperaturas han explicado aspectos relevantes de su funcionalidad en condiciones extremas (Vieille y Zeikus, 2001).

Sin embargo, las células también dependen de otras biomoléculas pequeñas, de bajo peso molecular, como distintos cofactores que intervienen en reacciones

redox y de obtención de energía, necesarios para el funcionamiento celular. Algunas de estas moléculas son muy inestables a temperaturas elevadas (Stetter, 1999; Hudson et al., 1993) lo que sugiere que deben existir mecanismos para que los organismos termófilos superen esta limitación a alta temperatura (Daniel y Cowan, 2000). Por ejemplo, aunque algunos factores como el pH y ciertos iones influyen en la estabilidad de NADH (Rover et al., 1998), no se conocen mecanismos que expliquen la estabilidad del NADH a temperaturas elevadas (Stetter, 1999; Daniel y Cowan, 2000). Comprender los fenómenos que proporcionan termoestabilidad a las pequeñas biomoléculas es crucial para explicar cómo los microorganismos termófilos son capaces de vivir a temperaturas elevadas (Cowan, 2004).

Las células de determinados microorganismos acumulan solutos compatibles específicos bajo estrés osmótico (da Costa et al., 1998; Calderón et al., 2004). Varios estudios han demostrado que algunos solutos compatibles también son acumulados en el citoplasma de organismos hipertermófilos en condiciones de estrés térmico (Empadinhas et al., 2006; Martins et al., 1997; Santos y da Costa, 2001). Además, algunas enzimas a altas temperaturas mantienen su estabilidad *in vitro* en presencia de solutos compatibles como la betaína, colina, 1-gliceril-1-mio-inositol fosfato, glicina, ectoína o trehalosa, entre otros (Empadinhas et al., 2006; Santos y da Costa, 2001; Caldas et al., 1999; Knapp et al., 1999). A pesar de estos resultados, los mecanismos por los que estos solutos confieren estabilidad térmica siguen siendo desconocidos.

Tal y como sugiere el modelo de "molecular crowding", el citoplasma de las células puede considerarse como una solución altamente concentrada de multitud de moléculas que interactúan entre sí (Goodsell, 1993; Luby-Phelps, 2000; Spitzer, 2011). Por tanto, su consistencia sería más parecida a un gel viscoso que una solución acuosa (Luby-Phelps, 2000; Pollack, 2001), lo que puede influir en diferentes propiedades celulares (Zimmerman et al., 1993). Por

ejemplo, se ha demostrado que la viscosidad juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura y funciones de las células (Pollack, 2001; Dijksterhuis et al., 2007; Sun, 2000). La viscosidad disminuye con la temperatura (Fogel'son y Likhachev, 2001). Una solución viscosa reduce enormemente los impactos entre biomoléculas lo que resultaría en una mayor estabilidad (Finkelstein et al., 2007; Rauscher et al., 2011). Un aumento de la temperatura provoca una disminución de la viscosidad celular (Fogel'son y Likhachev, 2001) y ello podría comprometer la estabilidad molecular y celular.

La viscosidad intracelular influye fuertemente en la difusión y la interacción entre las biomoléculas (Luby-Phelps, 2000; Pollack, 2001; Rauscher, et al., 2011). Sin embargo, estimar la viscosidad intracelular es difícil. La determinación de la viscosidad dentro de las células vivas, no puede realizarse con los métodos tradicionales (como los viscosímetros mecánicos). Para resolver este problema, se ha introducido el uso de métodos ratiométricos de fluorescencia que combinan medidas a dos longitudes de onda (Luby-Phelps et al., 1993). Más recientemente, el diseño de rotores moleculares fluorescentes ha facilitado la determinación de la viscosidad intracelular con mayor precisión (Peng et al., 2011). Los rotores moleculares son moléculas fluorescentes que se caracterizan por que presentan un dominio en su estructura química cuya capacidad de giro depende de las condiciones del medio. Este dominio gira libremente en soluciones de baja viscosidad mientras que en los entornos viscosos no. Esta rotación es inversamente proporcional a la intensidad de fluorescencia emitida. Peng et al. (2011) describió un rotor molecular fluorescente de nueva generación, RY3, que presenta dos picos de emisión (456 nm, azul y 650 nm, rojo) mostrando una fluorescencia mínima en entornos con baja viscosidad. La fluorescencia roja aumenta con la viscosidad, mientras que la fluorescencia azul permanece constante. La membrana celular es permeable a este rotor molecular. La relación entre estas dos medidas representa la base del método ratiométrico para determinar la viscosidad intracelular utilizando como

sensor esa molécula fluorescente (Peng et al., 2011). Hasta la fecha, las medidas de viscosidad celular únicamente han sido realizadas en células eucariotas. El citoplasma de células en cultivos celulares presenta valores de viscosidad sólo ligeramente superiores a los esperados para el agua o soluciones diluidas (Luby-Phelps et al., 1993).

El objetivo de este estudio es deducir si la viscosidad podría representar un factor potencial para mantener, al menos parcialmente, la termoestabilidad de pequeñas biomoléculas (por ejemplo, NADH) a temperaturas elevadas. Para ello, los experimentos realizados permitieron determinar las tasas de degradación de NADH en función de la temperatura y de la viscosidad. Además, el análisis de la viscosidad celular en varios procariotas sobre un amplio rango de temperatura sirvió para evaluar la relevancia de la estrategia propuesta. Llegar a comprender cómo las biomoléculas lábiles de bajo peso molecular pueden mantenerse estables a altas temperaturas contribuye a explicar cómo los microorganismos termófilos son capaces de prosperar a temperaturas extremas, utilizando básicamente las mismas biomoléculas que los organismos mesófilos.

### 5.3. Materiales y Métodos

La biomolécula de bajo peso molecular seleccionada para el estudio fue el NADH (Nicotin Adenin Dinucleótido), debido a la simplicidad de su uso y a su menor coste comparado con otras biomoléculas lábiles (Chenault y Whitesides, 1987). Los experimentos realizados iban destinados a determinar la estabilidad del NADH en función de la temperatura y la viscosidad. La viscosidad considerada en este estudio es la viscosidad dinámica (nos referiremos a ella en adelante como viscosidad; mPa·s). La viscosidad depende de la temperatura (Fogel'son y Likhachev, 2001). Las soluciones suplementadas con etilenglicol o ectoína proporcionaban las distintas viscosidades necesarias para nuestros



experimentos. Analizando muchas otras soluciones pudimos comprobar que la mayoría de compuestos ensayados generaban interferencias indeseables durante las mediciones de espectrofotometría y fluorescencia. La viscosidad se determinó utilizando un micro-viscosímetro VisioLab AMVn (Anton-Paar Inc., Graz, Austria) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **5.3.1. Efecto de la viscosidad sobre la estabilidad del NADH**

Un primer tipo de experimentos tuvo como objetivo determinar el efecto de la viscosidad sobre la estabilidad del NADH en un amplio rango de temperatura (20-90°C). Según Hofmann et al. (2010), la forma biológicamente oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) no es el intermediario principal. Los principales productos de la degradación térmica del NADH eran consecuencia de la hidrólisis y apertura oxidativa del anillo de la nicotinamida reducida (Hofmann et al., 2010). La composición de cada una de las soluciones estudiadas incluía tampón fosfato (pH 7,7) a concentraciones de 0,05M y 0,1M para las soluciones de etilenglicol (50% volumen/volumen) o de ectoína (0,45 mg ml/l), respectivamente. Este tampón proporcionaba máxima estabilidad al NADH (Rover et al., 1998). Una solución de agua tamponada que carecía de esos compuestos (etilenglicol y ectoína) sirvió de control. La adición de NADH (1 mM, concentración final) iniciaba el experimento. Los experimentos consistían en tres réplicas independientes para cada solución en un rango de temperatura que iba desde 20 a 90°C. Para medir la degradación del NADH se recogieron alícuotas a lo largo del tiempo de incubación hasta un máximo de 30-50 h, o hasta que el NADH descendía a niveles indetectables. La cuantificación de NADH por espectrofotometría (340 nm; Wu et al., 1986) utilizando un Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) proporcionaba los datos para el cálculo de la pendiente de degradación que seguía una cinética de primer orden. La tasa de degradación de NADH puede calcularse por regresión lineal (Sokal and Rohlf, 1995) del logaritmo neperiano

de los datos de concentración de NADH frente al tiempo de incubación. Las pendientes de valor absoluto alto corresponden a tasa de degradación alta y a una menor estabilidad. Los análisis estadísticos utilizados fueron las comparaciones entre coeficientes de regresión y análisis de varianza según Sokal y Rohlf (1995).

### **5.3.2. Efecto directo de la viscosidad sobre la degradación del NADH**

Un segundo tipo de experimentos tuvo como objetivo determinar el efecto directo de la viscosidad en la degradación del NADH a una temperatura constante. En estos experimentos, las soluciones con diferentes viscosidades utilizadas correspondían a las siguientes concentraciones de etilenglicol: 0 (sin etilenglicol), 10, 20, 30, 40, 50 y 60% (volumen/volumen). Las temperaturas ensayadas para determinar la tasa de degradación de NADH a esas diferentes viscosidades fueron 20, 50, 70 y 90°C. En el párrafo anterior ya han sido descritas las condiciones del ensayo. A diferencia del primer tipo de experimentos (párrafo anterior), este segundo tipo permitía evaluar el efecto de la viscosidad a una temperatura determinada.

### **5.3.3. Determinación de la viscosidad intracelular**

Para estimar la viscosidad intracelular utilizamos el rotor molecular fluorescente RY3 (Peng et al., 2011). La síntesis del colorante RY3 ha sido descrita previamente por Peng et al. (2011). Las cepas utilizadas en las medidas de viscosidad celular fueron las bacterias *Escherichia coli* K12 (CECT 433) (20, 30, 40°C), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (CECT 4122) (20, 40°C), *Lactococcus lactis lactis* (CECT 4433) (10, 15, 20, 30, 40°C), *Geobacillus thermoglucosidasius* (CECT 4038) (50, 60, 70°C) y *Fervidobacterium*

*thailandense* FC2004 (JCM 18757) (60°C, 70°C, 80°C); y la arquea *Pyrococcus furiosus* (DSM 3638) (70, 80, 90, 99°C). Las temperaturas de crecimiento de estas especies cubren el rango de temperatura de 10 a 100°C. Cada cepa fue cultivada en un medio de cultivo recomendado y a temperaturas determinadas (indicadas entre paréntesis) dentro de su rango de crecimiento. Las células se recogieron por centrifugación seguido por un lavado con solución salina (0,9% NaCl) o una solución de sales para especies marinas (medio de cultivo recomendado sin los componentes orgánicos). Las suspensiones celulares (con una densidad óptica igual a 1) fueron incubadas con el rotor molecular RY3 (5  $\mu$ M, concentración final) (Peng et al., 2011) a la temperatura de crecimiento durante 1 hora. Las medidas de fluorescencia ratiométricas siguieron el método descrito por Peng et al. (2011). RY3 presenta picos de excitación a 400 nm y de emisión a 456 (azul) y 650 nm (rojo). La intensidad (I) de emisión azul es insensible a los cambios en la viscosidad y la intensidad de fluorescencia roja aumenta con la viscosidad. Las medidas ratiométricas siguen una relación lineal con respecto a la viscosidad, de manera que la relación lineal entre  $\log(I_{650}/I_{456})$  y  $\log(\text{viscosidad})$  sigue el modelo de Förster-Hoffmann (Förster y Hoffmann, 1971). Medidas con diferentes soluciones de etilenglicol (de 10 a 60%) sirvieron para realizar esta calibración. Los datos de viscosidad y temperatura de crecimiento se relacionaron a través de una curva de ajuste no lineal siguiendo la función Log-Normal (3 parámetros) disponible en el software SigmaPlot (Systat Software Inc., Londres, Reino Unido).

Para estimar la posible interferencia entre el rotor molecular RY3 y las biomoléculas presentes en las células, se realizaron medidas del tiempo de vida de la fluorescencia (“time-resolved lifetime fluorescence”) utilizando un módulo para el recuento de fotones en función del tiempo de emisión (Fluorohub; Horiba Jobin Yvon, Edison, Nueva Jersey, Estados Unidos). La excitación óptica de las muestras, realizada con pulsos de 900 ps de duración producidos con un láser configurable (SC400; Fianium, Southampton, Reino Unido) a una longitud de

onda de 633 nm, dio lugar a la fluorescencia detectada a una longitud de onda de 715 nm. La función biexponencial:

$$I(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$$

fue el modelo seguido para obtener el mejor ajuste ( $1,1 < \chi^2 < 1,3$ ) de las curvas de decaimiento de fluorescencia de RY3. La variable  $\tau_{\text{avg}}$  representa el tiempo medio de decaimiento de la intensidad de fluorescencia ponderada de acuerdo con la fórmula:

$$\tau_{\text{avg}} = \frac{\sum A_i \tau_i^2}{\sum A_i \tau_i}.$$

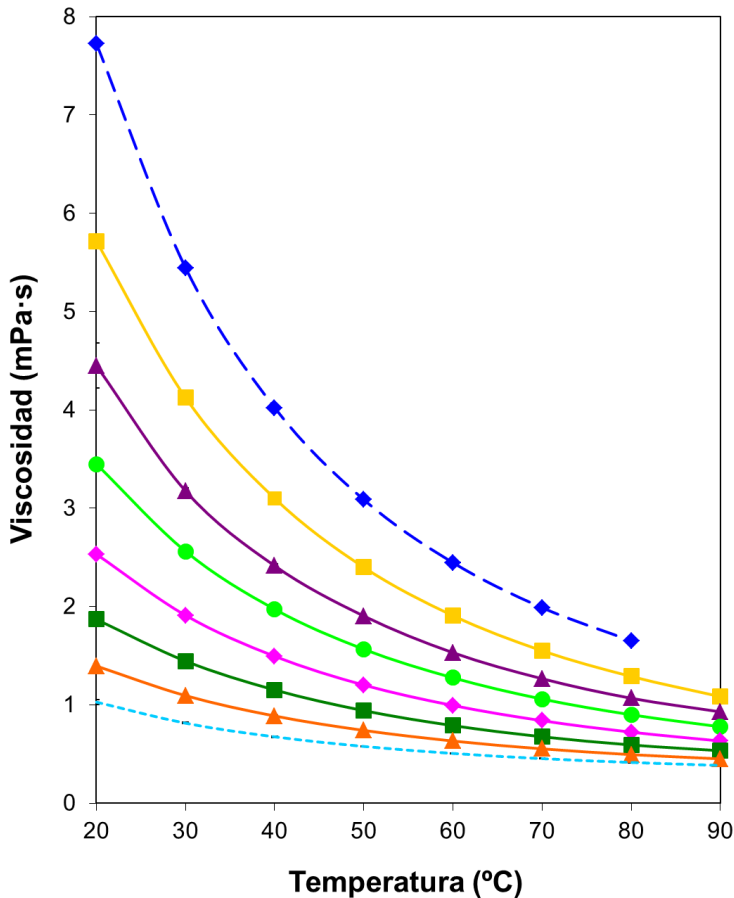
Un valor más elevado de  $\tau$  se correspondía con una viscosidad más elevada.

## 5.4. Resultados

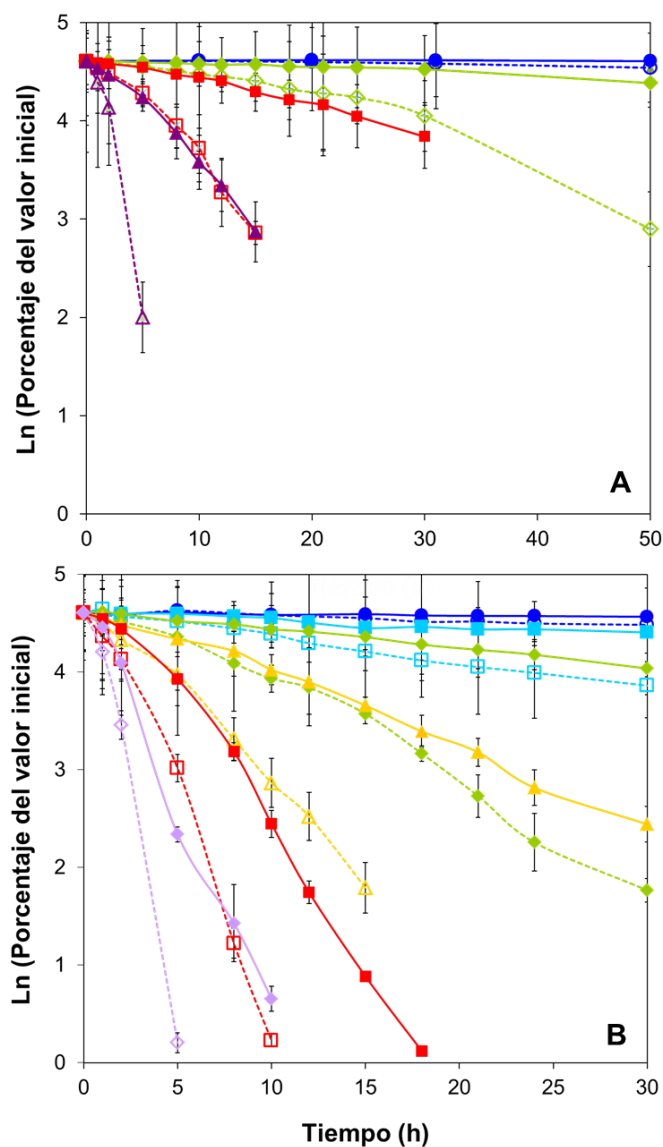
La persistencia del NADH fue analizada en soluciones con diferentes viscosidades dentro de un amplio rango de temperatura (20-90°C). La Figura 5.1 muestra las relaciones entre temperatura y viscosidad para las soluciones utilizadas en este estudio. La viscosidad del agua disminuye tres veces de 20 a 80°C. Las soluciones utilizadas con etilenglicol y ectoína permitieron obtener las viscosidades necesarias por encima de la referencia de los valores correspondientes al agua.

### 5.4.1. Efectos de la temperatura y la viscosidad en la degradación del NADH

La estabilidad del NADH a diferentes viscosidades y temperaturas a lo largo del tiempo mostró un patrón similar en soluciones de etilenglicol (50%, concentración final) o ectoína (0,45 mg ml/l) (Figura 5.2). A la temperatura más baja ensayada (20°C) el NADH permanecía estable durante el período de tiempo



**Figura 5.1.** Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de las diferentes soluciones utilizadas en este estudio: agua tamponada (línea discontinua azul claro), ectoína (0,45 mg/ml; línea discontinua azul con rombos), etilenglicol 10% (línea continua naranja con triángulos), 20% (línea continua verde con cuadrados), 30% (línea continua rosa con rombos), 40% (línea continua verde con círculos), 50% (línea continua púrpura con triángulos) y 60% (línea continua amarilla con cuadrados) ); ectoína (0,45 mg/ml; línea discontinua azul con rombos). Las barras de error (cubiertas por los símbolos) indican la desviación estándar.



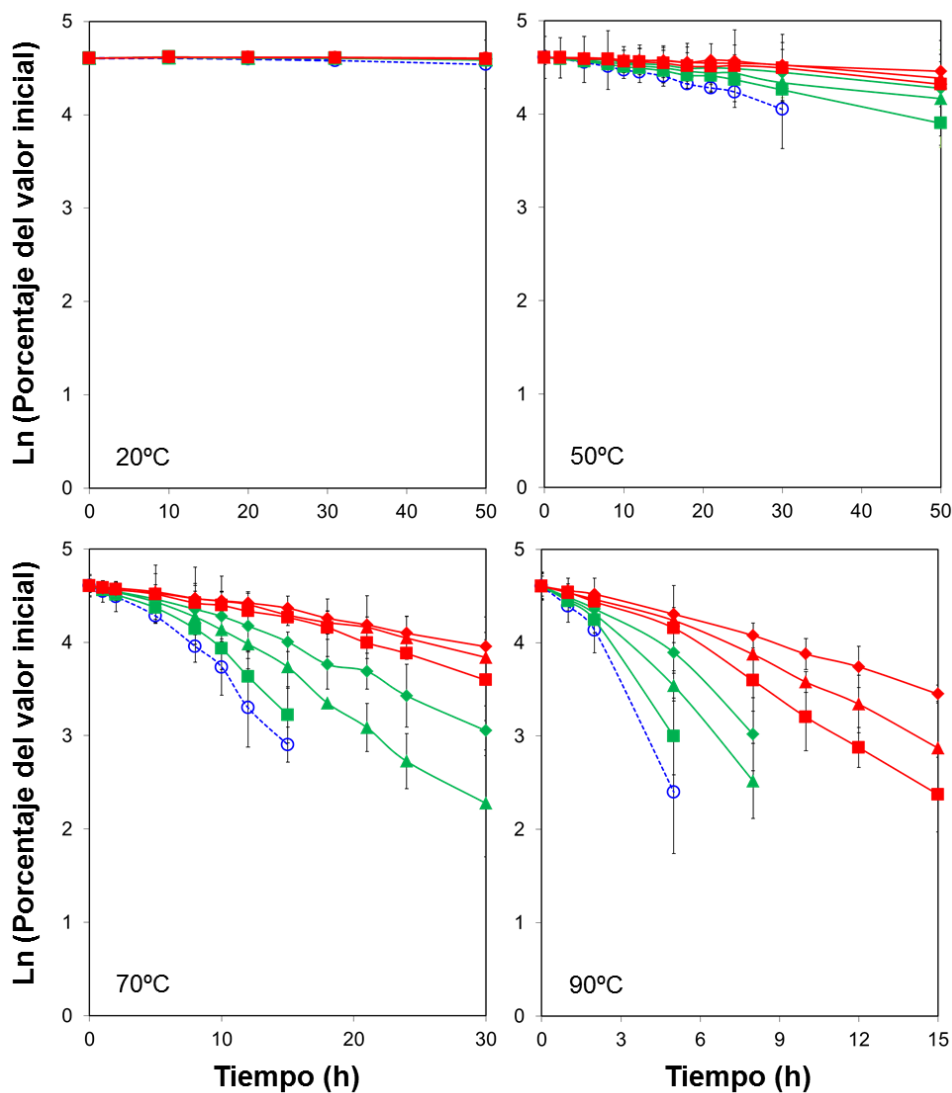
**Figura 5.2.** Estabilidad de NADH en función de la temperatura en solución tampón (líneas discontinuas y símbolos abiertos) y en soluciones de mayor viscosidad (líneas continuas con símbolos rellenos) con etilenglicol (**A**) o ectoína (**B**). Las temperaturas ensayadas fueron: 20°C (círculo azul oscuro), 40°C (cuadrado azul claro), 50°C (rombo verde), 60°C (triángulo amarillo), 70°C (cuadrado rojo), 80°C (rombo lila claro) y 90°C (triángulo púrpura). Las barras de error indican la desviación estándar.

analizado en este estudio tanto en el agua tamponada como en la solución de etilenglicol (Figura 5.2A). El aumento de la temperatura dio lugar a un acusado aumento de la degradación del NADH. A temperaturas de 50°C y superiores (hasta 90°C) las tasas de degradación de NADH en soluciones con viscosidad elevada (soluciones con etilenglicol) eran significativamente más bajas (en valores absolutos) que en las soluciones control, de baja viscosidad (agua tamponada), a una misma temperatura ( $P < 0,001$ ) (Figura 5.2A).

La tasa de degradación de NADH en las soluciones de ectoína (viscosidad alta) era menor ( $P < 0,001$ ) que en las soluciones que carecían de ectoína (en soluciones control de baja viscosidad) en el rango de temperatura desde 40 a 80°C (Figura 5.2B). A 20°C, el NADH se mantuvo aproximadamente constante a lo largo del experimento pero al aumentar la temperatura las tasas de degradación de NADH aumentaban (Figura 5.2B).

#### **5.4.2. Estabilización del NADH mediante el aumento de la viscosidad**

Estos experimentos, diseñados para evaluar la estabilización del NADH debido a la viscosidad, se realizaron a cuatro temperaturas diferentes (20, 50, 70, y 90°C). La Figura 5.3 presenta estos resultados. A 90°C, el aumento de la viscosidad dio lugar a una disminución de la tasa de degradación de NADH para un rango de viscosidad desde 0,4 a 1,1 mPa·s. A 70 y 50°C, un aumento de la viscosidad también dio lugar a un descenso de las tasas de degradación de NADH con viscosidades entre 0,5-1,5 mPa·s y 0,6-2,4 mPa·s, respectivamente. A una temperatura determinada (a 50°C y superiores), el aumento de la viscosidad resultaba en una mayor estabilidad del NADH (Figura 5.3). A 20°C, el NADH prácticamente no decayó durante estos experimentos en un rango de viscosidad desde 1 mPa·s a más de 5 mPa·s.



**Figura 5.3.** Estabilidad del NADH en función de la viscosidad ensayada a distintas temperaturas (20, 50, 70 y 90°C). Las soluciones con distinta viscosidad presentan concentraciones crecientes de etilenglicol (concentraciones finales): 0% (solución tampón sin etilenglicol; línea discontinua azul con círculos abiertos), 10% (línea verde con cuadrados), 20% (línea verde con triángulos), 30% (línea verde con rombos), 40% (línea roja con cuadrados), 50% (línea roja con triángulos) y 60% (línea roja con rombos). Las barras de error indican la desviación estándar.

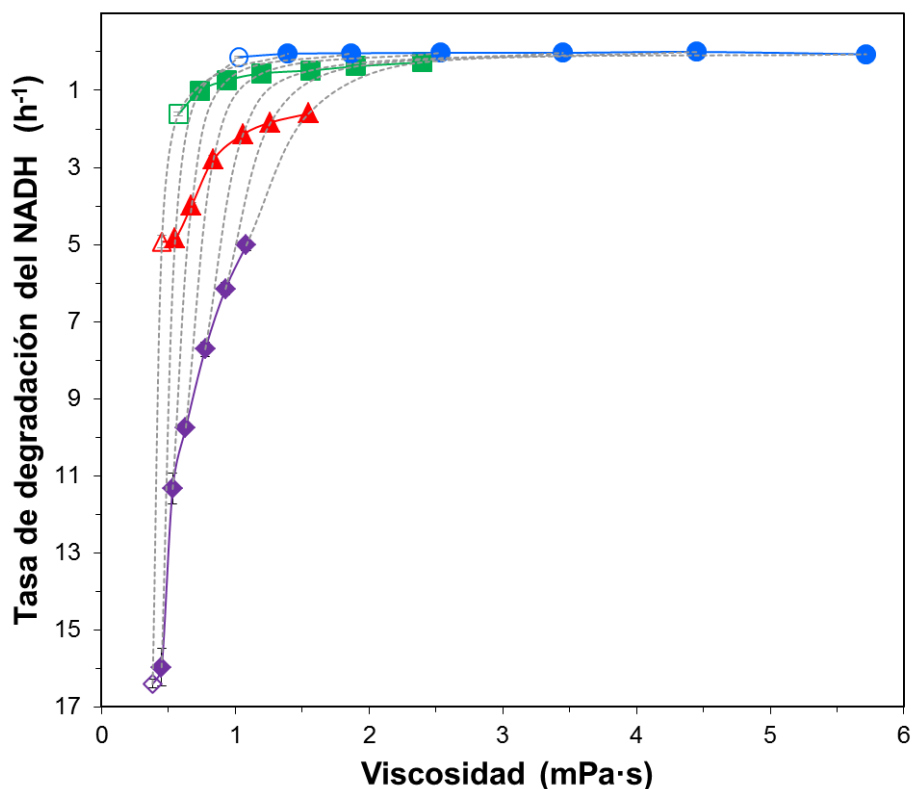


Comparativamente, las diferencias en las tasas de degradación de NADH a la viscosidad más baja y más alta disminuían a medida que la temperatura era más baja (Figura 5.4). A baja viscosidad (por ejemplo, a aproximadamente 0,5 mPa·s) el efecto de la temperatura era drástico, como podemos observar a 90°C, donde la tasa de degradación de NADH alcanzaba valores de hasta 16 h<sup>-1</sup>. Al comparar estos efectos a viscosidades altas (alrededor de 1,5 mPa·s), el NADH permanecía mucho más estable a lo largo de todo el rango de temperatura estudiado (20-90°C) mostrando una tasa de degradación nula (a 20°C) o por debajo de 3 h<sup>-1</sup> (a temperaturas más altas).

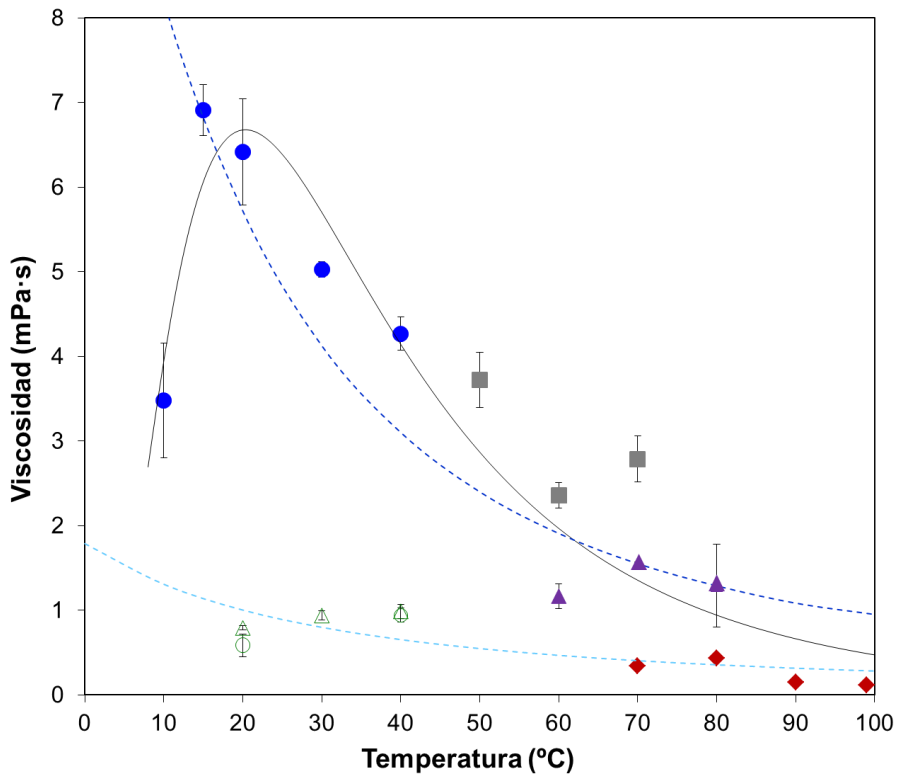
Las curvas de la velocidad de descomposición del NADH frente a la viscosidad (Figura 5.4) mostraban una reducción en la degradación del NADH a medida que la viscosidad aumenta. Las curvas a las temperaturas ensayadas (Figura 5.4) apuntaban hacia valores mínimos de degradación de NADH a valores cada vez más altos de viscosidad y hacia aumentos drásticos de las tasas de degradación de NADH a viscosidades bajas y altas temperaturas.

### 5.4.3. Viscosidad celular

Las distintas cepas procariotas estudiadas mostraron diferente viscosidad celular. La Figura 5.5 presenta estimaciones de la viscosidad en función de la temperatura de crecimiento para diferentes procariotas. *Escherichia* y *Pseudomonas*, con un rango de temperatura de crecimiento entre 20 y 40°C, presentaban valores de viscosidad celular muy similares y bajos, con valores similares a los del agua. *Lactococcus* presentaba una gran variación de la viscosidad celular a diferentes temperaturas. Por ejemplo, las células de *Lactococcus* cultivadas a la temperatura de ensayo más baja (10°C) mostraban una viscosidad muy por debajo de la que presentaban esas mismas células cuando eran cultivadas a 15-20°C. El pico de máxima viscosidad para *Lactococcus* ocurría entre 15 y 20°C. El descenso de la viscosidad celular en las



**Figura 5.4.** Relación entre la tasa de degradación de NADH y la viscosidad. Las temperaturas de ensayo fueron: 20 (línea y círculos azules), 50 (línea y cuadrados verdes), 70 (líneas y triángulos rojos) y 90°C (línea y rombos púrpuras). Concentraciones crecientes de etilenglicol (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60%; concentración final) proporcionaron los diferentes valores de viscosidad. Los símbolos abiertos representan las soluciones control sin etilenglicol. Las soluciones con idéntica concentración de etilenglicol están unidas por líneas discontinuas. Las tasas de degradación se presentan en valor absoluto ordenadas de menor (arriba) a mayor (abajo). Las barras de error indican la desviación estándar aunque están cubiertas por los símbolos en algunos casos.

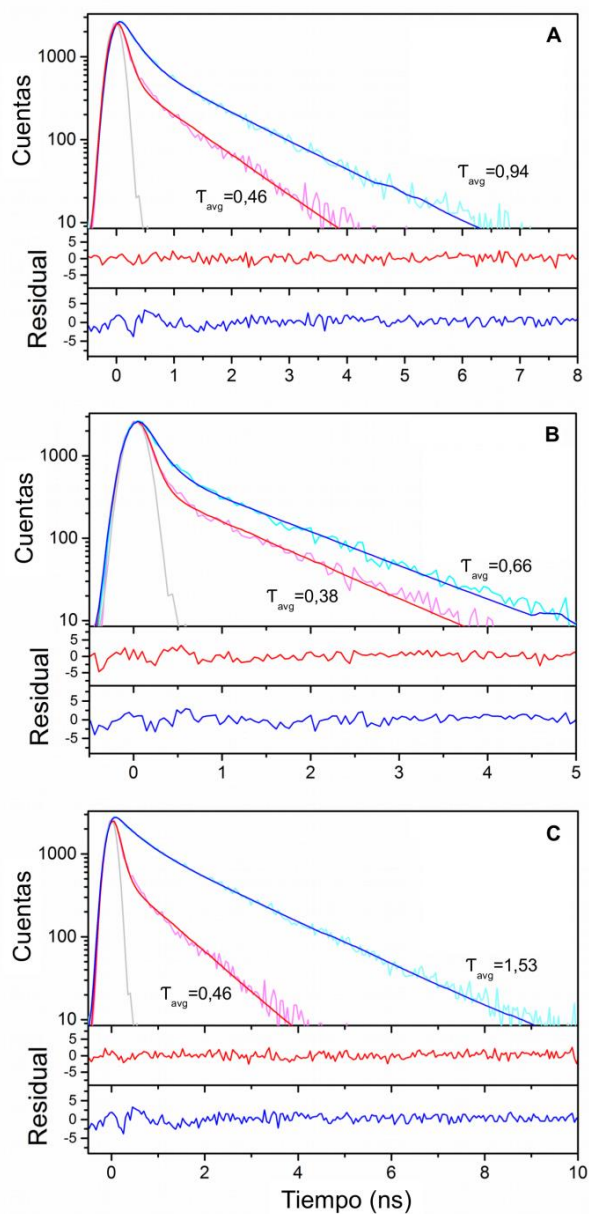


**Figura 5.5.** Relación entre viscosidad celular y temperatura de crecimiento en varios procariotas. *Escherichia coli* (triángulos verdes abiertos), *Pseudomonas aeruginosa* (círculos verdes abiertos), *Lactococcus lactis* (círculos azules), *Geobacillus thermoglucosidasius* (cuadrados grises), *Fervidobacterium thailandense* (triángulos lilas) y *Pyrococcus furiosus* (rombos rojos). La curva de ajuste para los datos de *Lactococcus*, *Geobacillus* y *Fervidobacterium* está también representada (línea continua en negro). Las líneas que relacionan la viscosidad del agua (línea discontinua azul claro) y del etilenglicol al 60% (línea discontinua azul oscuro) con la temperatura están incluidas como referencia. Las barras de error indican la desviación estándar, cubiertas por los símbolos en algunos casos.

células de *Lactococcus* a 10°C podría explicarse por una adaptación fisiológica al límite impuesto por el aumento exponencial de la viscosidad a temperaturas bajas. *Geobacillus* es una bacteria termófila cultivada en estos experimentos desde 50 a 70°C. *Geobacillus* presentaba menor viscosidad celular que *Lactococcus* pero mayor que las células de *Fervidobacterium*, crecidas desde 60 a 80°C. Las células de *Pyrococcus* cultivadas desde 70 a 99°C presentaban los valores más bajos de viscosidad determinados durante este estudio y se aproximaban a los valores de viscosidad esperados para el agua en el rango de temperatura ensayado.

La Figura 5.5 incluye las líneas correspondientes a la relación entre viscosidad y temperatura para el agua y para la solución al 60% de etilenglicol, que son las referencias indicativas del agua y de condiciones de alta viscosidad, respectivamente, utilizadas en los experimentos de degradación de NADH descritos en este estudio. Esta figura también incluye la línea resultante del análisis de ajuste no lineal para los datos de *Lactococcus*, *Geobacillus* y *Fervidobacterium* ( $P < 0,0001$ ;  $r = 0,95$ ;  $n = 11$ ). La viscosidad celular estimada para *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Pyrococcus* se situaba en el rango de viscosidad esperada para el agua a sus temperaturas de crecimiento. *Lactococcus*, *Geobacillus* y *Fervidobacterium* presentaban valores de viscosidad celular mucho más altos que el agua a sus temperaturas de crecimiento, mostrando valores aproximados al rango de viscosidad correspondiente a una solución de etilenglicol al 60%.

Las curvas de decaimiento de la fluorescencia (Figura 5.6) demostraron que no existía interferencia entre el colorante RY3 y las macromoléculas (por ejemplo, proteínas) presentes en las células. Si hubiese interferencias de este tipo cabría esperar una tasa de decaimiento de la fluorescencia más rápida como consecuencia de fenómenos de interferencia de la fluorescencia tipo “quenching” durante las medidas. Las curvas obtenidas presentan patrones



**Figura 5.6.** Curva de decaimiento de fluorescencia de RY3 para células de *Pyrococcus furiosus* a 30 y 80°C (A y B, respectivamente) y células de *Lactococcus lactis* a 30°C (C). Para cada una de las gráficas se representan los datos de la muestra (—) y su ajuste (—), del control (—) y su ajuste (—) y la función de respuesta instrumental (IRF; —). Las diferencias residuales entre datos y ajuste también quedan reflejadas en cada una de las figuras.

similares en las diferentes condiciones ensayadas (con y sin células y para diferentes tipos de células, *Pyrococcus* y *Lactococcus*). Las estimaciones de  $\tau_{\text{avg}}$  eran menores a temperaturas elevadas (Figura 5.6). El valor de  $\tau_{\text{avg}}$  para las células de *Pyrococcus* fue mayor que para el control, sin células. Para *Lactococcus*, el valor de  $\tau_{\text{avg}}$  era elevado, lo que correspondía con la elevada viscosidad celular que puede alcanzar esta bacteria (Figura 5.5).

## 5.5. Discusión

Determinadas biomoléculas que son necesarias para el funcionamiento de la célula muestran inestabilidad a altas temperaturas *in vitro* (Stetter, 1999; Daniel y Cowan, 2000). Sin embargo, todos los organismos celulares, incluyendo los termófilos, utilizan básicamente los mismos tipos de biomoléculas. Existen varios estudios que han intentado aclarar este tema centrándose principalmente en la estructura de las proteínas (Vieille y Zeikus, 2001; Berezovsky y Shakhnovich, 2005; Lee et al., 2002). No obstante, además de proteínas, el funcionamiento de la célula requiere de numerosas biomoléculas de bajo peso molecular. Daniel y Cowan (2000) han citado, por ejemplo, que el NADH es inestable a temperaturas elevadas. La molécula de NADH es esencial para las células, ya que participa en numerosos procesos del metabolismo central que implican transferencia de electrones. Este estudio muestra evidencia de la influencia de la viscosidad celular sobre la estabilidad de biomoléculas de bajo peso molecular a temperaturas elevadas, tomando como modelo la molécula de NADH.

La inestabilidad térmica del NADH (Stetter, 1999; Daniel y Cowan, 2000; Rover et al., 1998) ha sido confirmada en este estudio, mostrando mayor degradación al aumentar la temperatura. A temperaturas de 50°C y superiores, el NADH mostraba una clara disminución en el tiempo, lo que confirmaba

observaciones anteriores (Hofmann et al., 2010). El aumento de la viscosidad daba como resultado un aumento en la estabilidad del NADH a varias temperaturas. Las soluciones viscosas (con viscosidad mayor que el agua) utilizadas en los ensayos, contenían diferentes concentraciones de etilenglicol o ectoína. Ésta última, por ejemplo, se ha descrito como soluto compatible en células termófilas, pudiendo ser sintetizada por las células o captada del medio. La ectoína contribuye a la supervivencia de las células cuando aumenta la temperatura (Bursy et al., 2008; García-Esteva et al., 2006). Estudios previos han propuesto otras estrategias para superar la inestabilidad de las biomoléculas a alta temperatura pero los mecanismos reales aún no han sido resueltos (Cowan, 2004; Daniel y Cowan, 2000). Un trabajo previo (Dijksterhuis et al., 2007) ha descrito la asociación entre la alta viscosidad y la adaptación al estrés térmico en esporas de hongos, lo cual representa un ejemplo de que el mantenimiento de la viscosidad podría facilitar la resistencia de las células a largo plazo y la estabilidad térmica de sus biomoléculas. Como consecuencia, cabría sugerir que la acumulación de una gran variedad de solutos en las células termófilas podría ser un mecanismo para mantener la viscosidad del citoplasma y compensar, al menos parcialmente, la esperada disminución de la viscosidad en el interior celular debida al aumento de la temperatura.

La viscosidad disminuye considerablemente con la temperatura y, por tanto, se espera que la vida a altas temperaturas esté adaptada a este fenómeno. Los resultados han demostrado que las soluciones viscosas contribuyen significativamente a aumentar la estabilidad del NADH a altas temperaturas. Como consecuencia, el mantenimiento de la viscosidad en el citoplasma de los microorganismos termófilos podría representar un mecanismo para aumentar la estabilidad de biomoléculas de bajo peso molecular a temperaturas elevadas.

Con el fin de evaluar la relevancia de la viscosidad celular para estabilizar biomoléculas de bajo peso molecular a altas temperaturas, medimos la

viscosidad celular en distintos procariotas utilizando un nuevo rotor molecular fluorescente. Este estudio es el primero, hasta donde conocemos, en comparar la viscosidad celular en procariotas en un amplio rango de temperatura (de 10 a 100°C). Estos resultados indicaron que la viscosidad celular (i) depende de la especie y (ii) que puede depender de la temperatura de crecimiento.

En este estudio hemos observado dos estrategias básicas de la viscosidad celular en procariotas: 1) especies que mantienen una viscosidad celular relativamente alta (con valores similares a los de una solución de etilenglicol al 60%); y 2) especies que presentan una viscosidad celular relativamente baja (en el rango de viscosidad del agua y soluciones diluidas). Los procariotas que siguen la primera estrategia serían aquellos capaces de superar, al menos parcialmente, la inestabilidad de las biomoléculas de bajo peso molecular a altas temperaturas manteniendo viscosidades relativamente altas. Esta estrategia se ve apoyada por la observación que las células termófilas son capaces de acumular solutos orgánicos (Empadinhas y da Costa, 2006; Martins et al., 1997; Santos y da Costa, 2001) que podrían regular la viscosidad celular. Este grupo comprende a termófilos y termófilos extremos e incluye divisiones taxonómicas tales como Firmicutes y Thermotogae entre las especies estudiadas, con temperaturas de crecimiento en el rango de 50 a 80°C.

Un ejemplo interesante en este estudio es *Lactococcus*, que posee la capacidad de variar su viscosidad celular en función de su temperatura de crecimiento y presenta viscosidad máxima a 15-20°C. *Lactococcus* mostró la capacidad adaptativa de modificar drásticamente su viscosidad celular como respuesta al crecimiento en condiciones de temperatura baja (10°C) y moderadamente alta (30°C-40°C). Según nuestro conocimiento, esta es la primera cita que demuestra la capacidad de las células bacterianas de regular su viscosidad celular dependiendo de la temperatura de crecimiento.



Las gamma-proteobacterias examinadas en este estudio se corresponden con bacterias mesófilas típicas, Gram-negativas, y seguían la segunda estrategia. Estas especies presentaban una viscosidad celular al nivel del agua en el rango de temperatura entre 20 y 40°C. Estos niveles de viscosidad no presentan un compromiso para la estabilidad de las biomoléculas en ese rango de temperatura. Sin embargo, la arquea hipertermófila *Pyrococcus* también mostró viscosidades celulares alrededor de los valores esperados para el agua a las temperaturas más altas ensayadas. Las curvas de decaimiento de la fluorescencia indican que no existe interferencia entre el colorante RY3 y las biomoléculas presentes en las células en un amplio rango de temperatura. El parámetro  $\tau_{\text{avg}}$  obtenido para las células de *Pyrococcus* cultivadas a 80°C confirmó que estas células presentan una viscosidad celular ligeramente por encima del valor de agua; esto sólo puede contribuir, como mucho, parcialmente a la estabilización de biomoléculas pequeñas a esas temperaturas tan elevadas. La disminución de la viscosidad con la temperatura sugiere la existencia de mecanismos fisiológicos distintos o complementarios para evitar los efectos de la inestabilidad térmica de biomoléculas de bajo peso molecular en microorganismos hipertermófilos (>80°C). Entre algunos de los mecanismos propuestos se encuentran tasas de reposición altas, “metabolite channelling” y otras estrategias de estabilización local (Daniel y Cowan, 2000; Massant y Glansdorff, 2004).

## 5.6. Conclusiones

La viscosidad celular en los organismos procariotas es dependiente de la especie y puede variar como resultado de la temperatura de crecimiento dentro de una misma especie. El aumento de la viscosidad celular mejora la estabilidad del NADH a alta temperatura. La viscosidad celular observada para los termófilos y termófilos extremos (crecimiento óptimo entre 50 y 80°C) se corresponde con valores de viscosidad capaces de proporcionar una eficiente estabilización del

NADH y, probablemente, para otras biomoléculas de bajo peso molecular. Algunos mesófilos, como *Lactococcus*, son capaces de modificar la viscosidad celular dependiendo de la temperatura de crecimiento, lo que, probablemente, podría considerarse como un mecanismo adaptativo al estrés por bajas o altas temperaturas. Por otra parte, otras células (Gamma-Proteobacteria, *Pyrococcus*) presentan una viscosidad celular relativamente baja mostrando valores similares a los del agua. Este estudio contribuye significativamente a explicar la estabilidad de biomoléculas de bajo peso molecular en termófilos y termófilos extremos y a determinar la viscosidad celular en procariotas y su variabilidad.

## 5.7. Bibliografía

- Berezovsky, I. N., Shakhnovich, E. I. (2005) Physics and evolution of thermophilic adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 12742-12747.
- Bursy, J., Kuhlmann, A. U., Pittelkow, M., Hartmann, H., Jebbar, M., Pierik, A. J. Bremer, E. (2008) Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* a3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7286-7296.
- Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A., Richarme, G. (1999) Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* 145: 2543-2548.
- Calderón, M. I., Vargas, C., Rojo, F., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Ventosa, A., Nieto, J. J. (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043<sup>T</sup>. *Microbiology* 150: 3051-3063.
- Chenault, H. K., Whitesides, G. M. (1987) Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14: 147-197.
- Cowan, D. A. (2004) The upper temperature for life – where do we draw the line?. *TRENDS Microbiol.* 12: 58-60.
- da Costa, M. S., Santos, H., Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61: 117-153.
- Daniel, R. M., Cowan, D. A. (2000) Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 250-264.
- Dijksterhuis, J., Nijse, J., Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. (2007) High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. *Euk. Cell* 6: 157-170.
- Empadinhas, N., da Costa, M. S. (2006) Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. *Int. Microbiol.* 9: 199-206.

- Finkelstein, I. J., Massari, A. M., Fayer, M. D. (2007) Viscosity-Dependent Protein Dynamics. *Biophys. J.* 92: 3652-3662.
- Fogel'son, R. L., Likhachev, E. R. (2001) Temperature dependence of viscosity. *Tech. Phys.* 46: 1056-1059.
- Förster, T., Hoffmann, G. (1971) Die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten einiger Farbstoffsysteme. *Z. Phys. Chem. (Munich)* 75: 63-76.
- García-Esteva, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J. J., Vargas, C. (2006) The ectD gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* 188: 3774-3784.
- Goodsell, D. S. (1993) *The machinery of life*. Springer-Verlag, New York.
- Grogan, D. W. (1998) Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Mol. Microbiol.* 28: 1043-1049.
- Hofmann, D., Wirtz, A., Santiago-Schübel, B., Disko, U. Pohl, M. (2010) Structure elucidation of the thermal degradation products of the nucleotide cofactors NADH and NADPH by nano-ESI-FTICR-MS and HPLC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 398: 2801-2811.
- Hudson, R. C., Ruttersmith, L. D., Daniel, R. M. (1993) Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1. *Biochim. Biophys. Acta* 1202: 244-250.
- Knapp, S., Ladenstein, R., Galinski, E. (1999) Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes  $\beta$ -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* 3: 191-198.
- Lee, M., Gonzalez, J. M., Robb, F. T. (2002) Extremely thermostable glutamate dehydrogenase (GDH) from the freshwater archaeon *Thermococcus waiotapuensis*: cloning and comparison with two marine hyperthermophilic GDHs. *Extremophiles* 6: 151-159.

- Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* 192: 189-221.
- Luby-Phelps, K., Mujumdar, S., Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Galbraith, W., Waggoner, A. S. (1993) A novel fluorescence ratiometric method confirms the low solvent viscosity of the cytoplasm. *Biophys. J.* 65: 236-242.
- Martins, L. O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K. O., da Costa, M. S., Santos, H. (1997) Organic solutes in hyperthermophilic Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 896-902.
- Massant, J., Glansdorff, N. (2004). Metabolic channelling of carbamoyl phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: dynamic enzyme–enzyme interactions involved in the formation of the channelling complex. *Bioch. Soc. Trans.* 32: 306-309.
- Peng, X., Yang, Z., Wang, J., Fan, J., He, Y., Song, F. Wang, B., Sun, S., Qu, J., Qi, J., Yan, M. (2011) Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 6626-6635.
- Pollack, G. H. (2001) *Cells, gels and the engines of life: a new, unifying approach to cell function*. Ebner and Sons Publishers, Seattle.
- Rauscher, A. Simon, Á., Z., Szöllosi, G. J., Gráf, L., Derényi, I., Malnasi-Csizmadia, A. (2011) Temperature dependence of internal friction in enzyme reactions. *FASEB J.* 25: 2804-2813.
- Rover, Jr. L., Fernandes, J. C., de Oliveira Neto, G., Kubota, L. T., Katekawa, E., Serrano, S. H. (1998). Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. *Anal. Biochem.* 260: 50-55.
- Santos, H., da Costa, M. S. (2001) Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. *Meth. Enzymol.* 334: 302-315.

- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 3th edn. W.H. Freeman and Company, New York.
- Spitzer, J. (2011) From water and ions to crowded biomacromolecules: In vivo structuring of a prokaryotic cell. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75: 491-506.
- Stetter, K. O. (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.* 452: 22-25.
- Sun, W. Q. (2000) Dielectric relaxation of water and water-plasticized biomolecules in relation to cellular water organization, cytoplasmic viscosity, and desiccation tolerance in recalcitrant seed tissues. *Plant Physiol.* 124: 1203-1215.
- Takai, K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Horikoshi, K. (2008) Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 10949-10954.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 1-43.
- White, R. H. (1984) Hydrolytic stability of biomolecules at high temperatures and its implication for life at 250 degrees C. *Nature* 310: 430-432.
- Wu, J. T., Wu, L. H., Knight, J. A. (1986) Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin. Chem.* 32: 314-319.
- Zimmerman, S. B., Minton, A. P. (1993) Macromolecular Crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22: 27-65.

## *Capítulo 6*

# **Discusión y conclusiones generales**

## 6.1. Discusión

Los microorganismos que viven a temperaturas elevadas requieren una serie de adaptaciones que han desarrollado a lo largo de su evolución. Hoy en día, el estudio de los microorganismos termófilos despierta gran interés ya que son un punto clave para comprender el desarrollo de los seres vivos en nuestro planeta, los límites que permiten la vida tanto en la Tierra como en otros planetas y las numerosas posibles aplicaciones biotecnológicas que pueden tener estos microorganismos, sus enzimas y mecanismos adaptativos. El estudio de los microorganismos termófilos requiere una aproximación multidisciplinar. El presente trabajo es una muestra de esta necesidad y presenta varios análisis desde diferentes perspectivas que incluyen áreas tan diversas como por ejemplo, la ecología, con el análisis de comunidades microbianas y su diversidad, microbiología clásica y taxonomía, incluyendo el cultivo y caracterización de microorganismos, genómica, con la secuenciación y análisis de datos de ADN, y biofísica, sobre la estabilidad molecular y propiedades físico-químicas que permitan explicar el desarrollo de microorganismos a elevadas temperaturas.

En la actualidad, existe un intenso debate sobre cómo se distribuyen los microorganismos y qué factores afectan a la composición de las comunidades microbianas (Horner-Devine et al., 2004; Whitfield, 2005; Martiny et al., 2006). Esto es debido a la complejidad existente en los sistemas naturales por su enorme diversidad microbiana y el gran número de factores que afectan dichos ecosistemas (Ward, 2006). La temperatura es, por ejemplo, un factor decisivo en la distribución de los microorganismos (Brock et al., 1992; Garcia-Pichel et al., 2013). Los microorganismos termófilos que habitan fuentes termales se desarrollan a elevadas temperaturas y se esperaría que lo hiciesen en aquellas condiciones a las que se encuentran mejor adaptados. La mayoría de los estudios realizados en fuentes termales se centran en datos procedentes de distintas



fuentes termales. Nuestro trabajo, llevado a cabo en un sistema natural, una fuente termal de Mae Fang, es el primero en investigar un amplio gradiente de temperatura (de 50°C) localizado en una misma fuente termal. Este estudio representa un modelo para analizar la distribución de los microorganismos, específicamente, en función de la temperatura.

Un resultado importante es que las condiciones ambientales (en este caso la temperatura) claramente limitan la distribución de los microorganismos. En el sistema modelo estudiado, los microorganismos se distribuyen principalmente de acuerdo a la temperatura a la que se encuentran mejor adaptados. Si generalizásemos este resultado, podríamos deducir que los factores ambientales determinan claramente la distribución de los microorganismos en la naturaleza.

Los microorganismos que constituyen las comunidades microbianas en la fuente termal Mae Fang estudiada se encuentran distribuidos siguiendo los límites impuestos por las condiciones ambientales y rellenan completamente la zona de estudio que incluye un gradiente de 50°C (desde 39°C hasta 90°C). Las comunidades se suceden a lo largo del gradiente estudiado y estas sucesiones incluyen no sólo factores abióticos (como la influencia crítica de la temperatura) sino que sugiere la influencia de fenómenos bióticos que incluyen distintos tipos de relaciones entre los microorganismos como, por ejemplo, comensalismo o coexistencia y competencia o exclusión. Si comparamos los rangos de distribución de cualquiera de los microorganismos detectados con estudios similares en cultivos de laboratorio comprobaremos que el rango que permite el crecimiento de un microorganismo dado (20-40°C) (Wiegel, 1990; Madigan et al., 2003) es superior al rango que observamos en la naturaleza (generalmente, <10°C en nuestro caso en la fuente termal de Mae Fang). Ello sugiere que cada microorganismo únicamente es capaz de desarrollarse allí donde sus condiciones de crecimiento son óptimas y se ve desplazado por otros microorganismos mejor adaptados cuando las condiciones de temperatura se alejan de esos valores

óptimos. En nuestro sistema modelo (fuente termal de Mae Fang) los resultados obtenidos indican que la distribución de los microorganismos seguiría modelos similares a los establecidos para organismos superiores (Martiny et al., 2006; Prosser et al., 2007), respondiendo así a la polémica actual sobre distribución y biogeografía microbiana y justificando en parte la elevada diversidad microbiana existente en nuestro planeta.

La investigación realizada en la fuente termal de Mae Fang ha servido para detectar un fenómeno típico en ecología de organismos superiores pero que no se había citado para comunidades microbianas. Se trata del “efecto frontera” (Saunders et al., 1991) observado en este estudio a 50°C y 70°C. Estas dos temperaturas representan posibles límites de adaptación fisiológica necesarias para que los microorganismos puedan desarrollarse en las condiciones de temperatura existentes. Estas zonas parecen corresponder exactamente con la clasificación empírica de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento (Pikuta et al., 2007; Itoh y Iino., 2013). Por ejemplo, los microorganismos que se desarrollan óptimamente hasta 50°C serían los mesófilos que limitarían con los termófilos que viven entre 50 y 70°C. A su vez, los termófilos se verían restringidos a vivir hasta los 70°C y a temperaturas más elevadas tendrían su hábitat los termófilos extremos e hipertermófilos con temperaturas óptimas de crecimiento por encima de los 70°C. Esta clasificación podría deberse a requerimientos adaptativos, uno de los cuales, la termoestabilización de biomoléculas, se ha analizado también en este estudio.

El cultivo y aislamiento de microorganismos del ecosistema estudiado ha hecho posible un análisis más detallado sobre un determinado microorganismo (Palleroni, 1997). En este estudio se ha obtenido y caracterizado una nueva especie *Fervidobacterium thailandense* cepa FC2004. Esta bacteria es un termófilo extremo perteneciente a la división Thermotogae. El aislamiento de este nuevo microorganismo ha facilitado la secuenciación de su genoma lo que

ha permitido un análisis adicional del mismo. Específicamente, se ha analizado la posible existencia de fenómenos de transferencia horizontal de información genética que, como se ha mencionado, posee un papel decisivo en la evolución de los microorganismos.

En la actualidad, un concepto generalizado es que la distribución de diferentes genes en árboles filogenéticos daría como resultado una estructura compleja a modo de red más que a una imagen de árbol de ramas independientes (Doolittle, 2000). Esto es debido a la existencia de numerosos casos de HGT entre microorganismos, mencionado en el capítulo correspondiente. Sin embargo, la detección y evaluación de los fenómenos de HGT resulta aún complicada (Ravenhall et al., 2015). En este trabajo hemos observado que el empleo de ISs o elementos móviles permitiría obtener una visión amplia sobre la posibilidad de ocurrencia de estos procesos de HGT y la detección de los pares de microorganismos implicados. Efectivamente, utilizando las secuencias de ISs, que son numerosas en el género *Fervidobacterium*, hemos podido detectar la existencia de varios fenómenos de HGT en la historia reciente de las especies de *Fervidobacterium*. Las ISs nos permiten analizar las secuencias de los genes que codifican transposasas y las secuencias repetitivas o palindrómicas que los flanquean. El grado de homología o conservación de estos fragmentos de ADN permite distintas comparaciones y el empleo de diferentes herramientas de análisis coincide en apuntar la veracidad de esos intercambios de material genético. En este estudio, los análisis que se llevaron a cabo a través de la construcción de árboles filogenéticos, el análisis multifactorial de distribución de tetranucleótidos, las medidas de divergencia y la similitud de secuencias repetitivas, permitieron detectar grupos taxonómicamente independientes (pertenecientes a distintas divisiones bacterianas) que presentaban relaciones muy próximas. Concretamente, se ha comprobado que el género *Caldicellulosiruptor* (Firmicutes) está muy asociado al género *Fervidobacterium* (Thermotogae) por frecuentes procesos de HGT.

La asociación o proximidad física entre distintos microorganismos es una condición que se considera necesaria para que pueda existir transferencia de material genético a través de procesos de HGT (Hooper et al., 2009). Algunos estudios han sugerido que las condiciones de estrés a las que están sometidos los microorganismos termófilos, y extremófilos en general, favorecerían la transferencia de material genético (van Wolferen et al., 2013; Urbietta et al., 2015). Estas condiciones extremas podrían implicar un aumento de la presión ambiental sobre esos microorganismos para alcanzar un mayor grado de adaptación a las necesidades que imponen las condiciones ambientales extremas. En nuestro estudio hemos observado que Thermotogae y Firmicutes están representados por miembros de la comunidad microbiana entre 70 y 80°C en la fuente termal estudiada. Otros estudios también confirman que *Fervidobacterium* y *Caldicellulosiruptor* comparten hábitats en otras fuentes termales (Kublanov et al., 2009; Sahm et al., 2013).

Gracias a los resultados de distribución bacteriana, hemos comprobado la existencia de gran variedad de bacterias que viven a temperaturas elevadas y compiten o comparten su hábitat con otros grupos. Para poder desarrollarse a esas altas temperaturas, estos microorganismos han de estar adaptados a vivir en esas condiciones. Uno de los requisitos básicos que han de satisfacer sería el mantenimiento de la estabilidad de sus biomoléculas. Existen numerosos trabajos sobre la termoestabilidad de las macromoléculas de importancia biológica, como, por ejemplo, proteínas (Vieille y Zeikus, 2001; Kumar et al., 2010). Sin embargo, se desconocía cómo los microorganismos termófilos pueden vivir a elevadas temperaturas y mantener la estabilidad de numerosas pequeñas biomoléculas universales (como el NADH, ATP, etc.) cuya inestabilidad a esas temperaturas es bien conocida (Daniel y Cowan, 2000). Recordemos que los microorganismos termófilos utilizan, básicamente, las mismas biomoléculas que el resto de los seres vivos. En nuestro trabajo, hemos demostrado que el NADH se estabiliza al aumentar la viscosidad celular. La

viscosidad disminuye exponencialmente al aumentar la temperatura (Fogel'son y Likhachev, 2001). Sin embargo, nuestros datos muestran que los microorganismos termófilos son capaces de mantener la viscosidad celular en valores similares o superiores a los del agua a 20°C, hasta, al menos, 80°C, lo cual es suficiente para garantizar la termoestabilidad del NADH (como modelo de estudio). Este mecanismo representaría un sencillo y original mecanismo adaptativo que permitiría a los microorganismos termófilos vivir en las condiciones de temperatura a las que se desarrollan.

Nuestro estudio es el primero en llevar a cabo medidas de viscosidad celular en procariotas. Es destacable que estas determinaciones han demostrado que la viscosidad celular depende de la especie que se estudie y, probablemente, el factor más decisivo es la temperatura de crecimiento del microorganismo estudiado. A este respecto, es muy interesante el caso de *Lactococcus lactis*. Esta especie es capaz de regular la viscosidad celular dependiendo de su temperatura de crecimiento, por ejemplo, disminuyendo la viscosidad a temperaturas muy bajas. Las bases moleculares de esta regulación aún permanecen sin conocerse, pero este mecanismo representaría una clara evidencia de adaptación a la vida o supervivencia a bajas temperaturas, y un modelo para el estudio de la adaptación al frío en microorganismos psicrófilos.

El estudio de la vida a temperaturas altas abre las puertas al desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, como fruto de los estudios de estabilización térmica de biomoléculas hemos presentado una patente (González et al., 2014) sobre la estabilización de moléculas con aplicación en procedimientos analíticos, clínicos o en el almacenamiento de compuestos orgánicos bajo condiciones adversas (Sauve, 2008). Por otro lado, la caracterización de *F. thailandense* y la secuenciación de su genoma permiten la detección de actividades enzimáticas y de los genes correspondientes con potencial biotecnológico. Este interés biotecnológico es debido a la estabilidad y

durabilidad que generalmente presentan las enzimas de bacterias termófilas. Por ejemplo, *F. thailandense* presenta actividad queratinasa (Romruen et al., 2016) lo que puede ser utilizado para el reciclaje de residuos (especialmente plumas) en el sector de curtido de pieles, en la industria textil y en granjas avícolas (Gupta et al., 2013). Además, otras de las actividades enzimáticas detectadas en esta bacteria termófila son la capacidad para degradar almidón, celobiosa o carboximetilcelulosa, por lo que esta cepa podría ser de utilidad para la transformación de polisacáridos, por ejemplo, en el tratamiento de residuos vegetales y la obtención de biocombustibles a partir de biomasa.

## 6.2. Conclusiones

El trabajo realizado ha dado lugar a las siguientes conclusiones principales:

- Los factores ambientales abióticos (temperatura) y bióticos (competencia y coexistencia) compartimentan la distribución de los microorganismos en la naturaleza siguiendo un modelo altamente estructurado y comparable a organismos superiores. Este trabajo contribuye significativamente a explicar la elevada complejidad y diversidad existente en el mundo microbiano.
- *Fervidobacterium thailandense* FC2004 es una nueva especie bacteriana termófila extrema y anaeróbica, aislada de una fuente termal de Mae Fang (Tailandia).
- Los genes que codifican transposasas representan un modelo adecuado para detectar fenómenos de transferencia horizontal entre microorganismos filogenéticamente distantes e identificar los taxones implicados. En el caso del género *Fervidobacterium*, se observaron diversos fenómenos de HGT destacando su relación con *Caldicellulosiruptor* (Firmicutes).
- El mantenimiento de la viscosidad celular representa una estrategia para estabilizar moléculas de bajo peso molecular (por ejemplo, NADH) en microorganismos termófilos hasta temperaturas de 80°C. Algunas bacterias como *Lactococcus* pueden regular su viscosidad celular para crecer a bajas temperaturas.

### 6.3. Trabajos publicados incluidos en este estudio

- Cuecas, A., Portillo, M. C., Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J. M. (2014) Bacterial distribution along a 50°C temperature gradient reveals a parceled out hot spring environment. *Microb. Ecol.* 68: 729-739.
- González, J. M., Cuecas, A., Portillo, M. C., Cruces, J. (2015) Procedimiento de estabilización de biomoléculas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España. ES2502666B1.
- Cuecas, A., Cruces, J., Galisteo-López, J. F., Peng, X., Gonzalez, J. M. (2016) Cellular viscosity in prokaryotes and thermal stability of low molecular weight biomolecules. *Biophys. J.* 111: 875-882.
- Kanoksilapatham, W., Pasomsup, P., Keawram, P., Cuecas, A., Portillo, M. C., Gonzalez, J. M. (2016) *Fervidobacterium thailandense* sp. nov., a novel extreme thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Northern Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 5023-5027.
- Cuecas, A., Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J. M. (2017) Evidence of horizontal gene transfer by transposase gene analyses in *Fervidobacterium* species. *PLoS One* 12: e0173961.



## 6.4. Bibliografía

- Brock, T. D., Madigan, M. T. (1992) *Biology of microorganisms*, 6th edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Doolittle, W. F. (2000) Uprooting the tree of life. *Sci. Am.* 282: 90-95.
- Garcia-Pichel, F., Loza, V., Marusenko, Y., Mateo, P., Potrafka, R. M. (2013) Temperature drives the continental-scale distribution of key microbes in topsoil communities. *Science* 340: 1574-1577.
- Hooper, S. D., Mavromatis, K., Kyrpides, N. C. (2009) Microbial co-habitation and lateral gene transfer: what transposases can tell us. *Genome Biol.* 10: R45.
- Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., Bohannon, B. J. (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432: 750-753.
- Itoh, T., Iino, T. (2013) Phylogeny and biological features of thermophiles. In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y. (eds) *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer, Dordrecht.
- Kublanov, I. V., Perevalova, A. A., Slobodkina, G. B., Lebedinsky, A. V., Bidzhieva, S. K., Kolganova, T. V., Kaliberda, E. N., Rumsh, L. D., Haertlé, T., Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2009) Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 286-291.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2003) Brock biology of microorganisms. Prentice Hall/Pearson Education. Upper Sadle River, Nueva Jersey, EEUU.
- Martiny, J. B. H., Bohannon, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreås, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., Staley, J.T. (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 102-112.

- Palleroni, N.J. (1997) Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Anton. Leeuw. Int. J. G* 72: 3-19.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., Tang, J. (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.* 33: 183-209.
- Prosser, J. I., Bohannon, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J.L., Green, L.E., Killham, K., Lennon, J.J., Osborn, A.M., Solan, M., van der Gast, C.J., Young, J.P. (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 384-392.
- Ravenhall, M., Škunca, N., Lassalle, F., Dessimoz, C. (2015) Inferring horizontal gene transfer. *PLoS Comput. Biol.* 11: e1004095.
- Romruen, U., · Gonzalez, J. M., · Kanoksilapatham, W. (2016) Identification of a putative keratinase gene and analysis of a peptidase S8 Family from a hyperthermophilic isolate, *Fervidobacterium* sp. strain FC2004 in Thailand. 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai society of Biotechnology and International Conference. 28-30 Noviembre, 2016. Chiang Mai, Tailandia.
- Sahm, K., John, P., Nacke, H., Wemheuer, B., Grote, R., Daniel, R., Antranikian, G. (2013) High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods. *Extremophiles* 17: 649-662.
- Saunders, D. A., Hobbs, R. J., Margules, C. R. (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conserv. Biol.* 5: 18-32.
- Urbiet, M. S., Donati, E. R., Chan, K. G., Shahar, S., Sin, L. L., Goh, K. M. (2015) Thermophiles in the genomic era: biodiversity, science, and applications. *Biotechnol. Adv.* 33: 633-647.
- van Wolferen, M., Ajon, M., Driessen, A. J., Albers, S. V. (2013) How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions. *Extremophiles* 17: 545-563.
- Ward, D. M. (2006) Microbial diversity in natural environments: focusing on fundamental questions. *Anton. Leeuw. Int. J. G* 90: 309-324.

- Wiegel, J. (1990) Temperature spans for growth: hypothesis and discussion.  
*FEMS Microbiol. Rev.* 6: 155-169.
- Whitfield, J. (2005) Biogeography: is everything everywhere? *Science* 310: 960.

